



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

보건학 석사 학위논문

생명정보학적 분석을 통한 인슐린
저항성 관련 신호전달 경로 연구

- AS160과 TBC1D1의 기질 특이성 분석 -

**Bioinformatics Research on Signaling Pathways
that Affect Insulin Resistance**

- Analysis of substrate specificity of AS160 and TBC1D1 -

2015년 8월

서울대학교 보건대학원
보건학과 생명정보학 전공

유 태 곤

생명정보학적 분석을 통한 인슐린 저항성 관련 신호전달 경로 연구

- AS160과 TBC1D1의 기질 특이성 분석 -

지도교수 손 현 석

이 논문을 보건학 석사학위논문으로 제출함

2015년 5월

서울대학교 보건대학원

보건학과 생명정보학 전공

유 태 곤

유태곤의 석사학위논문을 인준함

2015년 7월

| | | |
|---------|-------|-----|
| 위 원 장 | 정 해 원 | (인) |
| 부 위 원 장 | 조 성 일 | (인) |
| 위 원 | 손 현 석 | (인) |

국 문 초 록

생명정보학적 분석을 통한 인슐린 저항성 관련 신호전달 경로 연구 - AS160과 TBC1D1의 기질 특이성 분석 -

서울대학교 보건대학원 보건학과
생명정보학 전공

유 태 곤

당뇨병은 신체 활동이 감소하고 비만의 유병률이 증가함에 따라 유병률이 점차 증가하고 있는 만성 질환으로, 급성 합병증과 만성 합병증의 발생 위험을 줄이기 위해서 철저하게 관리해야 한다. 당뇨병의 90% 이상을 차지하는 제 2형 당뇨병은, 근육 세포 및 지방 세포의 인슐린 저항성이 발병 원인이다. 혈액 내의 포도당을 근육 세포 및 지방 세포 내로 수송하는 역할은 GLUT4 (Glucose transporter 4)가 담당하는데, 인슐린이 GLUT4를 세포막으로 유도시키는 과정에 문제가 발생하여 근육 및 지방 세포의 인슐린 자극에 대한 반응이 떨어지는 현상을 인슐린 저항성이라고 정의한다. 인슐린 저항성이 발생하는 원인을 확인하기 위해서는 우선 인슐린에 의한 정상적인 세포 내 신호 전달 경로를 파악하는 것이 필수적이다. 인슐린이 결합함으로써 활성화된 인슐린 수용체는 IRS (insulin receptor substrate), PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase), PDK1 (3-phosphoinositide-dependent kinase), mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex-2) 등의 단백질을 경유하여 Akt를 인산화시켜 활성화시킨다. 활성화된 Akt는 AS160의 특정 모티프를 인식하고 인산화시킴으로써 AS160의 Rab GAP (Rab

GTPase-activating protein) 도메인을 불활성화시키고, 그 결과 Rab 단백질에 결합된 GTP의 가수 분해를 억제하여 활성 상태로 유지함으로써 GLUT4의 세포막으로의 이동을 촉진시킨다. 반면 근육 세포에서 근육의 수축이 일어날 경우에는 AMPK가 활성화되고, 활성화된 AMPK가 AS160 및 TBC1D1을 인산화시킴으로써 GLUT4의 세포막으로의 이동을 촉진시킨다. 그러나 TBC1D1의 역할 및, TBC1D1의 Rab GAP 도메인이 어떠한 Rab 단백질과 상호 작용을 하는지에 대해서는 명확히 알려져 있지 않다. 따라서, 이번 연구에서는 생명정보학적 기법을 사용하여 AS160 및 TBC1D1의 Rab GAP 도메인의 기질로 어떠한 Rab 단백질들이 작용하는지를 분석하고, 상호 작용의 양상에 어떠한 차이가 존재하는지를 확인하여 두 단백질의 역할의 차이를 예측하고자 하였다. 이번 연구에서는 단백질 도킹 프로그램을 이용하여 Rab GAP 도메인의 기질 특이성을 분석하였다. 우선, PDB (Protein Data Bank) 에서 AS160과 TBC1D1의 Rab GAP 도메인, 그리고 Rab 단백질의 구조를 PDB 파일로 다운로드 받았고, 도킹에 앞서 FoldX를 사용하여 구조의 오류를 수정하였다. 다음 단계로, 단백질 도킹 프로그램인 Hex와 ClusPro에 수정된 PDB 파일을 입력하여 Rab GAP 도메인과 Rab 단백질 간의 도킹을 수행하였고, FoldX를 이용하여 각 프로그램에서 최적의 도킹 모형으로 선정된 단백질 복합체의 상호 작용 에너지를 계산하였다. 마지막으로, 임의의 절사점으로 각 상호 작용 에너지를 선택하였을 때에, 전체 Rab 단백질 중 각 절사점에서 Rab GAP 도메인과 상호 작용하는 Rab 단백질의 비율을 차례대로 계산하고, 이 계산 결과를 기존 실험 연구 결과와 비교하였다. AS160과 TBC1D1 유전자의 발현을 동시에 억제하여 이중 녹아웃 마우스(double knockout mouse)를 만들고, 어느 정도의 기능 상실이 일어나는지를 연구하였던 기존의 한 연구를 확인해 본 결과, AS160과 TBC1D1이 세포 내로의 포도당 수송에 관여하는 비율은

각각 47.72%와 48.15%였다. Hex의 경우에는 가상의 절사점 중 91.41kcal/mol이 이에 해당하며, 이 때에 AS160 및 TBC1D1과 상호 작용 가능성이 높은 단백질로는 Rab1A, Rab2A, Rab4A, Rab4B, Rab8A, Rab11A, Rab18이 있었다. ClusPro의 경우에는 가상의 절사점 중 265.90kcal/mol이 이에 해당하며, 이 때에 AS160 및 TBC1D1과 상호 작용 가능성이 높은 단백질로는 Rab1A, Rab5A, Rab7, Rab14, Rab18, Rab21이 있었다. 이 결과는 세포 외에서 수행되었던 기존 연구 결과와 유사하였다. 결론적으로, Rab 단백질들 중에서 AS160 또는 TBC1D1의 Rab GAP 도메인과 상호 작용하는 비율은, 생체 내에서 AS160과 TBC1D1이 담당하는 포도당 수송의 양에 비례한다.

.....
주요어 : 인슐린 저항성, GLUT4, AS160, TBC1D1, Rab 단백질,
단백질 도킹

학 번 : 2011-23868

부족한 제자를 열과 성을 다해 이끌어 주셨던
지도교수님께 이 논문을 바칩니다.

목 차

| | |
|-------------|------|
| 국문 초록 | i |
| 목 차 | v |
| 표 목 차 | vii |
| 그림 목차 | viii |
| 약어 목록 | ix |

제 1 장. 서 론

| | |
|-------------------|----|
| 1.1 연구 배경 | 1 |
| 1.2 연구의 필요성 | 29 |
| 1.3 연구의 목적 | 29 |

제 2 장. 연구 방법

| | |
|------------------------------------|----|
| 2.1 도메인의 기질 특이성 분석 | 38 |
| 2.2 데이터 세트의 구성 | 40 |
| 2.3 FoldX를 이용한 최적화 | 42 |
| 2.4 Hex와 ClusPro를 이용한 단백질 도킹 | 44 |
| 2.5 FoldX를 이용한 결합 자유 에너지의 계산 | 48 |
| 2.6 상호 작용 에너지 절사점의 선정 | 49 |

| | |
|--|----|
| 제 3 장. 연구 결과 | |
| 3.1 Hex와 ClusPro를 이용한 단백질 도킹 결과 | 58 |
| 3.2 FoldX를 이용한 상호 작용 에너지 계산결과 | 59 |
| 3.3 임의의 절사점 선택 시, Rab GAP 도메인과 Rab 단백질들의 상호 작용 비율 | 60 |
| 제 4 장. 논의 및 결론 | |
| 4.1 연구 결과 정리 | 69 |
| 4.2 AS160/TBC1D1 유전자의 발현을 억제하였던 기존 실험 연구에 대한 고찰 | 70 |
| 4.3 기존 실험 연구로 도출된 절사점의 적용 | 72 |
| 4.4 AS160/TBC1D1과 상호 작용 가능성이 높은 Rab 단백질의 결정 | 73 |
| 4.5 본 연구의 의의와 한계점 | 74 |
| 제 5 장. 요약 및 총론 | |
| 5.1 연구 결과 요약 및 결론 | 77 |
| 5.2 총론 및 제언 | 79 |
| 참고문헌 | 81 |
| Abstract | 98 |

표 목 차

| | |
|---|----|
| Table 3.1 Docking results of Rab GAP domain of AS160 and TBC1D1 with Rab proteins using Hex, according to E-total | 61 |
| Table 3.2 Docking results of Rab GAP domain of AS160 and TBC1D1 with Rab proteins using ClusPro, according to size of cluster | 62 |
| Table 3.3 Calculated interaction energy of Rab GAP domain of AS160 and TBC1D1 with Rab proteins using Hex | 63 |
| Table 3.4 Calculated interaction energy of Rab GAP domain of AS160 and TBC1D1 with Rab proteins using ClusPro | 65 |
| Table 3.5 Temporary cutoff values of interaction energy and the percentage of the Rab proteins that interact with Rab GAP domains of AS160 or TBC1D1 | 67 |

그림 목 차

| | |
|--|----|
| Figure 1.1 Schematic structure of GLUT4 (Glucose transporter 4) | 32 |
| Figure 1.2 The molecular signaling pathways involved in contraction-induced GLUT4 gene activation | 33 |
| Figure 1.3 A model for intracellular GLUT4 trafficking | 34 |
| Figure 1.4 Signaling pathways for GLUT4 translocation in adipocytes ... | 35 |
| Figure 1.5 Schematic domain structures of human AS160 and TBC1D1 .. | 36 |
| Figure 1.6 Signaling pathways for GLUT4 translocation in muscle cells .. | 37 |
| Figure 2.1 The flowchart of the protocol of protein docking using in this study | 49 |
| Figure 2.2 Structures of Rab GAP domains of AS160 and TBC1D1 | 50 |
| Figure 2.3 Structures of Rab proteins | 51 |
| Figure 2.4 Repairing the PDB file (Rab4B) by using RepairPDB command of FoldX program | 54 |
| Figure 2.5 The docking process of Rab GAP domain of AS160 and Rab1A protein using Hex 8.0.0 program | 55 |
| Figure 2.6 The docking process of Rab GAP domain of AS160 and Rab1A protein using ClusPro | 56 |
| Figure 3.1 The docking results using Hex | 64 |
| Figure 3.2 The docking results using ClusPro | 66 |

약 어 목 록

| | |
|------------------|--|
| ACAP1 | Arf-GAP with coiled-coil, ANK repeat and PH domain-containing protein 1 |
| ACTN4 | Alpha-actinin-4 |
| AMPK | AMP-activated protein kinase |
| aPKC | Atypical protein kinase C |
| APS | Adaptor molecules containing pleckstrin homology (PH) and Src homology 2 (SH2) domains |
| Arf6 | ADP-ribosylation factor 6 |
| Arp3 | Actin related protein-3 |
| AS160 | Akt substrates of 160kDa |
| BNL | Brookhaven National Laboratories |
| CaMK | Calcium/calmodulin-dependent protein kinases |
| CaMKII | Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II |
| CAP | c-Cbl-associated protein |
| Cav-actin | Caveolin-associated filamentous actin |
| CBD | Calmodulin-binding domain |
| Cbl | Casitas b-lineage lymphoma |
| CHC22 | Clathrin heavy chain 22 |
| CrkII | CT10 regulator of kinase protein II |
| Daxx | Death associated protein 6 |
| EDL | Extensor digitorum longus |
| EFF | Empirical force field |
| F-actin | Filamentous actin |
| FFT | Fast Fourier transform |
| GEF | GLUT4 enhancer factor |
| GGA | Golgi-localized, γ -ear-containing, ADP-ribosylation factor-binding proteins |
| GLUT4 | Glucose transporter 4 |
| GSV | GLUT4 storage vesicle |
| HAT | Histone acetyltransferase |
| HDAC5 | Histone deacetylase 5 |
| IRAP | Insulin-regulated aminopeptidase |
| IRS | Insulin receptor substrate |
| LRP1 | Low density lipoprotein receptor-related protein 1 |
| MEF2 | Myocyte enhancer factor 2 |
| mTOR | Mammalian target of rapamycin |

| | |
|--------------------|---|
| mTORC2 | Mammalian target of rapamycin complex-2 |
| NAC | N-acetylcysteine |
| NMR | Nuclear magnetic resonance |
| N-WASP | Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein |
| PDB | Protein Data Bank |
| PDK1 | 3-Phosphoinositide-dependent kinase |
| PI(3,4,5)P3 | Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate |
| PI(4,5)P2 | Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate |
| PI3K | Phosphatidylinositol-3-kinase |
| PLD1 | Phospholipase D1 |
| PTB | Phosphotyrosine-binding |
| Rab GAP | Rab GTPase-activating protein |
| RMSDs | Root-mean-squared deviations |
| SFT | Spherical Fourier transform |
| SPF | Spherical polar Fourier |
| TGN | Trans-Golgi network |
| TUG | Tether containing a UBX domain, for GLUT4 |
| Ubc9 | Ubiquitin carrier protein 9 |
| UBX | Ubiquitin-like |
| VAMP2 | Vesicle associated membrane protein 2 |
| VAMP3 | Vesicle-associated membrane protein 3 |
| Vti1a | Vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1A |

제 1 장. 서 론

1.1 연구 배경

당뇨병은 급성 합병증과 만성 합병증의 발생 위험을 줄이기 위해 철저하게 관리해야 할 만성 질환 중의 하나이다. 신체 활동이 감소하고 비만의 유병률이 증가함에 따라 세계적으로 당뇨병의 유병률은 점차 증가하고 있다. 2010년을 기준으로 세계 인구의 약 6.4%인 2억8500만명이 당뇨병을 앓고 있으며, 현재의 증가 추세를 감안하면 2030년에는 당뇨병 이환 인구가 세계 인구의 약 7.7%인 4억 3900만명에 도달할 것으로 예상된다(Shaw et al., 2010). 당뇨병은 혈관계 합병증을 유발하여 심혈관 및 뇌혈관질환의 발생률을 2배 가량 증가시킬 뿐만 아니라(Sarwar et al., 2010), 모든 원인으로 인한 사망률을 80%, 암으로 인한 사망률을 25% 증가시킨다는 점에서 체계적인 관리가 필요한 질병이다(Seshasai et al., 2011).

당뇨병은 발생 원인에 따라 제1형 당뇨병과 제2형 당뇨병으로 구분된다. 제1형 당뇨병은 인슐린을 분비하는 췌장 베타세포의 파괴로 인하여 발생하는 절대적인 인슐린 양의 결핍이 주된 발병 원인이다. 반면에 전체 당뇨병의 90% 이상을 차지하는 제2형 당뇨병은 근육 세포 및 지방 세포의 인슐린 저항성 및 이로 인해 2차적으로 발생하는 인슐린 분비 장애가 발병 원인이다(American Diabetes, 2014). 인슐린 저항성과 인슐린 분비 장애는 둘

다 제2형 당뇨병의 초기에서부터 발생하며, 두 기전 사이의 연관성에 대해서는 아직 명확히 밝혀지지 않은 부분이 다수 존재한다(Kahn, 2003).

1.1.1 인슐린 저항성과 GLUT4

인슐린은 GLUT4(Glucose transporter 4)를 근육 및 지방 세포의 세포막에 유도시켜 혈액 내의 포도당을 세포 내로 수송하는 중요한 역할을 담당하며, 이 과정에 문제가 발생하여 근육 및 지방 세포의 인슐린 자극에 대한 반응이 떨어지는 현상을 인슐린 저항성이라고 정의한다(Dugani and Klip, 2005). 한 예로, GLUT4 유전자의 특정 염기 서열에 돌연변이가 있는 경우 당뇨병의 평가 기준인 당화혈색소 수치가 더 높게 나오기도 한다(Xi et al., 2012). 따라서 이 인슐린 저항성이 발생하는 세포생물학적 기전을 규명하는 과정은 제2형 당뇨병에 대한 근본적인 이해에 있어서 필수적이고 이는 근본적인 치료제의 개발로 이어질 수 있는 단서가 된다. 다음 단락부터는 GLUT4의 조절 기전에 대하여 단계적으로 소개하고자 한다. 우선 GLUT4의 구조 및 유전자 발현의 조절에 대해 알아보고, 그 다음에는 GLUT4가 다른 세포 내 단백질과 어떻게 다른 분류 과정을 거치는지에 대해 확인할 것이며, 마지막으로 인슐린 또는 운동 등의 자극에 의해서 GLUT4가 세포막으로 어떻게 이동하여 포도당의 수송에 관여하는지 기술하였다.

1.1.2 GLUT4의 구조

GLUT4는 ATP를 사용하지 않는 촉진확산(facilitated diffusion)에 의해, 세포 외의 육탄당(hexose)을 세포 내로 수송하는 역할을 담당하는 13개의 당 수송체 중 하나이다(Hruz and Mueckler,

2001; Joost and Thorens, 2001). 이들은 지방 및 근육 조직뿐만 아니라 뇌, 간, 신장 등 육탄당을 필요로 하는 여러 조직에 분포하고 있으며, 서열의 유사성에 따라 3개의 클래스로 구분된다. 이 중에서 GLUT4가 속해 있는 ‘클래스 I GLUT 수송체’들은 포도당을 수송하는 역할을 담당하고, 공통적인 구조로 나선(helix) 5에 QL 모티프 가지고 있으며, 세포 외 고리(extracellular loop) 7에 STSIF 모티프를 가지고 있는 것이 특징이다. 특히 QL 모티프의 Glu-161, STSIF 모티프의 Ser-294, Thr-295의 경우 포도당 수송에 필수적인 잔기로 알려져 있으며, 이 부위에 돌연변이가 발생하면 GLUT4의 구조에 변형이 발생하여 포도당 수송 능력이 감소하는 것으로 보고 되었다(Mueckler et al., 1994; Doege et al., 1998).

‘클래스 I GLUT 수송체’들은 포도당을 필요로 하는 조직에 광범위하게 분포하고 있으나, 각 조직 세포 내부에서의 분포 양상은 조직에 따라서 차이를 보인다. 뇌의 경우에는 지속적으로 많은 양의 포도당을 필요로 하며, 따라서 뇌의 세포막에는 GLUT 수송체의 농도가 지속적으로 높게 유지된다. 반면에 지방 및 근육 세포의 경우, 평소에는 GLUT 수송체가 세포 내부에 주로 존재하다가, 인슐린이나 운동 등의 자극이 가해지는 경우에는 세포막으로의 이동이 급격히 증가하여, 포도당 수송량이 평소의 10~40배까지 증가하는 양상을 보인다(Bryant et al., 2002). 뇌에 존재하는 GLUT 수송체는 GLUT1과 GLUT3인 반면, 지방과 근육 세포에서 특정 자극에 따라 세포 내에서 세포막으로 이동하는 GLUT 수송체는 GLUT4임이 밝혀졌다(Bryant et al., 2002; Czech and Corvera, 1999). 다른 GLUT 수송체와는 다른 GLUT4만의 이러한 특징은, 이를 조절하는 특이적인 신호 전달 체계가 존재함을 시사하며, 동시에 이와 관련된 특정 기능을 담당하는 모티프가 GLUT4 아미노산 서열 내에 위치함을 의미한다(Figure 1.1). N-말단의 FQQI 모티프와 C-말단의 LL

모티프, TELEY 모티프가 이에 해당하며, 이들은 GLUT4가 세포 내에서 다른 세포막 단백질과는 다른 경로로 분류되는 과정에 중요한 역할을 담당한다(Blot and McGraw, 2008).

1.1.3 GLUT4 유전자 발현의 조절

GLUT4의 발현은 세포 내부 및 세포 외부의 다양한 인자에 의하여 조절된다. 인슐린 저항성을 가지고 있는 당뇨 환자의 지방 세포에서는 GLUT4 발현이 저하되어 있으며(Sinha et al., 1991), 반면 운동 시에는 골격근의 GLUT4 발현이 증가하는 것으로 확인되었다(Holmes and Dohm, 2004; Hussey et al., 2012). GLUT4 발현의 정도가 인슐린 항상성의 유지에 필요한 조건 중의 하나임을 고려할 때, 이를 유발하는 기전에 대해 확인하는 것은 인슐린 저항성 치료의 목표를 설정하는 데에 중요한 시사점을 제공할 수 있다. GLUT4 유전자 5' 말단의 프로모터 영역에는 2.4kb의 염기 서열이 위치하고 있으며, 이는 GLUT4의 조직 특이적인 발현에 필요한 정보를 모두 제공할 뿐만 아니라, 호르몬 및 대사 과정에 의한 발현 조절에도 일부 관여한다(Liu et al., 1992). 추가적인 연구 결과, 이 부분에는 90% 이상의 서열이 보존된 2개의 도메인이 있는 것으로 확인되었다. 첫 번째는 ‘도메인 I’로, 전사 개시 시점으로부터 -742~-712 지역에 위치하며, GEF (GLUT4 enhancer factor)가 여기에 결합하는 것으로 확인되었다(Oshel et al., 2000). 두 번째 도메인은 ‘MEF2 (Myocyte enhancer factor 2) 도메인’으로, 전사 개시 시점으로부터 -526~-412 지역에 위치하며, MEF2 전사 인자가 결합할 수 있는 자리를 제공하고 있다(Olson and Knight, 2003). ‘도메인 I’와 ‘MEF2 도메인’ 사이의 보존되지 않은 서열을 제거하였을 경우에는 전사 활성도에 영향을 미치지 않았으나, 두 도메인을 모두 제거하면 GLUT4의 발현 정도가 모든 조직에서 뚜렷하게 저하되는 것으로

확인되었다(Olson and Pessin, 1995). 그러나 ‘도메인 I’의 일부를 제거하고 ‘MEF2 도메인’을 보존하였을 경우에도 GLUT4의 정상적인 발현과는 다소 차이가 있어, ‘MEF2 도메인’만으로 GLUT4 프로모터의 기능을 모두 담당하기에는 충분하지 않음을 알 수 있으며(Thai et al., 1998), 결론적으로 GEF와 MEF2 전사 인자는 GLUT4의 전사 조절에 복합적으로 관여하는 것으로 결론을 내릴 수 있다(Oshel et al., 2000). 그러나 구체적으로 어떠한 기전에 의하여 GLUT4의 전사 과정이 조절되는지에 대해서는 밝혀지지 않은 부분이 많다. ‘MEF2 도메인’에는 MEF2 동형 단백질 (isoform) 중에서 MEF2A 및 MEF2D가 결합하며(Thai et al., 1998), 이 중에서 인슐린 결핍 시에 결합의 활성도가 변화하는 인자는 MEF2A가 유일한 것으로 확인되었다(Zheng et al., 2001; Song et al., 2002). 그러나 이들이 구체적으로 GLUT4의 발현에 어떻게 관여하는지에 대해서는 정확히 알려져 있지 않다. 최근의 연구 결과에 따르면, 근육이 수축하는 경우 세포 내 칼슘 농도가 상승하면서 활성화된 CaMKII (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II)가 MEF2A와 결합하여 있던 HDAC5 (Histone deacetylase 5)를 인산화하여 분리시키고, 이 자리에 HAT (Histone acetyltransferase)가 결합하여 히스톤 꼬리를 아세틸화시켜 DNA와의 결합을 느슨하게 하며, 결과적으로 MEF2A의 ‘MEF2 도메인’에의 접근성이 높아져 GLUT4의 발현이 증가하는 것으로 확인되었다(Ojuka et al., 2012). 실제로 제2형 당뇨병 환자가 운동을 하였을 경우 골격근의 GLUT4 발현이 증가하는 것도 이러한 사실을 뒷받침한다(Hussey et al., 2012). 또한 MEF2A가 MEF2 도메인에 결합하면서 GEF의 ‘도메인 I’에 대한 결합 활성도가 증가하며, MEF2A의 부재 시에는 HDAC5가 GEF와 상호 작용하면서 GLUT4 프로모터의 활성을 억제시키는 것으로 확인되었다(Sparling et al., 2008). 이러한 결과로부터 MEF2A가 GEF와 복합체를 형성하여

GLUT4의 전사 조절에 중요한 역할을 담당할 것으로 예상할 수 있으나, 그 정확한 기전에 대해서는 추후 연구가 필요하다. 또한 GLUT4의 전사를 촉진하는 과정에는 AMPK(AMP-activated protein kinase)도 중요한 역할을 담당한다. 근육의 수축에 의하여 활성화된 AMPK는 CaMKII와 마찬가지로 MEF2A를 직접 인산화하지는 않으나, HDAC5를 인산화하여 분리시킴으로써 MEF2A의 MEF2 도메인에 대한 접근성을 향상시킨다(McGee et al., 2008). 동시에 활성화된 AMPK는 GEF를 인산화시킴으로써 GLUT4 유전자의 프로모터 부위에 더 잘 결합하도록 한다(Holmes et al., 2005). 지금까지 서술한 근육의 수축이 GLUT4의 유전자를 활성화시키는 전 과정은 Figure 1.2에 정리되어 있다.

지금까지 GLUT4의 구조 및 유전자 발현의 조절에 관하여 설명하였다. 다음 단락에는 GLUT4를 포함한 다른 몇 가지 단백질이 GSV (GLUT4 storage vesicle) 내에 조립되는 과정에 대해 정리하고, 인슐린 자극의 유무에 따라 GSV가 세포 내부 또는 세포막 근처에서 어떠한 방식으로 조절되는지에 대해 설명할 것이다(Figure 1.3).

1.1.4 GLUT4 소포의 생성과 조절

인슐린의 자극이 없는 상태에서는 세포 내 GLUT4의 75%는 소포 및 소관에 존재하며, 나머지는 TGN(Trans-Golgi network) 및 엔도솜(endosome)에 존재한다(Bryant et al., 2002). GLUT4를 함유하는 소포는 다시 두 종류로 나뉘는데, 하나는 인슐린의 자극에 의하여 세포막에 융합하는 GSV이고, 다른 하나는 인슐린의 자극과 무관한 세포 내 수송 소포이다(Kupriyanova et al., 2002). GSV의 막에는 GLUT4를 비롯하여 IRAP(Insulin-regulated aminopeptidase), sortilin, LRP1(Low density lipoprotein receptor-related protein 1)이

존재하며(Jedrychowski et al., 2010), 또한 소포의 융합에 관여하는 v-SNARE 중의 하나인 VAMP2(Vesicle-associated membrane protein 2)도 존재한다(Grusovin and Macaulay, 2003). 이들 단백질은 특수한 세포 내 과정을 거쳐서 GSV로 이동한다. 세포막에 존재하는 GSV 단백질들은 세포 내부의 분류 엔도솜(sorting endosome)으로 이동하고, 분류 과정을 거쳐서 TGN의 서브도메인(subdomain)인 ‘donor membrane’으로 이동하며, 일부는 재활용 엔도솜(recycling endosome)에 도착한다. 인간의 골격근에서는 분류 엔도솜에서 TGN으로 이동하는 이 역행 수송 과정에 syntaxin-10 및 CHC22 (Clathrin heavy chain 22)가 관여한다(Esk et al., 2010). 이처럼 GSV 단백질들이 ‘donor membrane’으로 정확하게 분류될 수 있는 이유는 이들의 세포질 도메인(cytoplasmic domain)이 특이적인 신호로 작용하기 때문이며(Shi and Kandror, 2005; Shi et al., 2008; Li et al., 2009), 이 과정에서 GSV 단백질들의 내강 도메인(luminal domain)의 상호 작용을 바탕으로 GSV 단백질들이 추후 GSV로 함께 분류될 수 있도록 한다(Shi et al., 2008; Jedrychowski et al., 2010).

다음 단계로, ‘donor membrane’에서는 GSV 단백질 및 기타 요소들의 상호 작용으로 인하여 GSV가 생성된다. 이 과정에는 클라트린 피복(clathrin coat)과 GGA (Golgi-localized, γ -ear-containing, ADP-ribosylation factor-binding proteins), 그리고 ACAP1 (Arf-GAP with coiled-coil, ANK repeat and PH domain-containing protein 1)이 필요하다(Li and Kandror, 2005; Li et al., 2007). 우선, GGA와 상호 작용하는 유일한 GSV 단백질은 sortilin으로 알려져 있다. Sortilin의 내강 도메인이 GLUT4, IRAP, LRP1 등의 다른 GSV 단백질과 상호 작용한다는 점을 고려할 때, sortilin은 GSV의 막에 위치하면서 이들을 모아서 큰 복합체를 형성하는 골격으로서의 역할을 할 것으로 예상된다. 그리고, GSV 단백질들은 GGA에 의하여 소포의

출아 과정을 거치면서 GSV의 형태를 갖추게 된다(Shi and Kandror, 2005). 다음 단계로 ACAP1은 GLUT4의 세포질 쪽 고리 (cytoplasmic loop)와 상호 작용하여, 출아한 GSV에 클라트린 피복을 가져와 둘러싸는 역할을 담당한다(Li et al., 2007). 또한 GGA와 ACAP1은 Arf6 (ADP-ribosylation factor 6)와 상호작용을 하는 것으로 확인되었다(Takatsu et al., 2002; Li et al., 2007). Arf6는 여러 세포에서 엔도솜의 재활용과 관련된 역할을 담당하는 단백질로(D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006), 특히 지방 세포에서 핵 주변부의 'donor membrane'에 존재하는 GLUT4와 위치가 겹치는 양상이 확인되어 GSV의 생성 과정에서도 일정 역할을 담당할 것으로 예측된다(Li et al., 2007).

한편 세포막에 위치하던 GSV 단백질이 아닌, 새로 합성된 GSV 단백질 중에서 GLUT4와 IRAP의 경우는 다른 막 단백질처럼 세포막으로 바로 이동하는 것이 아니라, 인슐린의 자극에 반응하는 세포 내 소기관으로 6-9시간 이내에 이동한다(Watson et al., 2004; Hou et al., 2006). 이러한 특이적인 이동은 GSV 단백질의 세포질 도메인의 특이적 신호에 의한 것이다. GLUT4의 경우에는 이 신호를 담당하는 영역이 N-말단과 중심부 고리(central loop)에 존재하며(Khan et al., 2004), IRAP의 경우에는 76-77번 자리의 dileucine 모티프가 이 신호 역할을 담당한다(Hou et al., 2006). 또한, 세포막으로부터 재활용되는 경우뿐만 아니라 새로 합성되는 GSV 단백질의 경우에도 특이적인 이동 과정에 GGA를 필요로 한다(Watson et al., 2004; Hou et al., 2006). 이 과정에서 재활용되는 GSV 단백질과 새로 합성된 GSV 단백질이 서로 다른 기원으로부터 각각 이동하는지, 아니면 새로 합성되는 GSV 단백질이 기존 단백질에 섞여서 동일한 과정을 거치는지에 대해서는 아직 밝혀지지 않았다.

위의 과정을 거쳐서 생성된 GSV는, 인슐린의 자극이 없는 상태에서는 세포 내에서 일정량을 지속적으로 유지한다. 이 과정이 아직 명확하게 밝혀진 것은 아니지만, 아마도 TGN과 엔도솜 사이의 순환 과정에 GSV가 참여할 것으로 예상된다(Govers et al., 2004; Karylowski et al., 2004). 세포 내로 섭취된 GLUT4가 세포 내에서 존재하기 위해서는 TGN과 융합하기 위한 SNARE 복합체가 필요하며(Rubin and Bogan, 2009), 인간의 경우 syntaxin-16, syntaxin-10, Vtila (Vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1A), VAMP3 (Vesicle-associated membrane protein 3)가 이와 관련된 SNARE 복합체를 구성하는 핵심 요소로 알려져 있다(Ganley et al., 2008; Esk et al., 2010). GSV가 트랜스페린 수용체(transferrin receptor)를 가지고 있는 엔도솜과 합쳐지지 않는다는 사실을 고려할 때(Govers et al., 2004), 유력한 가능성 중의 하나는 GSV가 TGN으로부터 생성 또는 융합되는 순환 과정을 반복하고, 이 과정이 엔도솜과 완전히 분리되어 있어서 결과적으로 세포 내에 GSV를 충분히 유지할 수 있다는 것이다(Bogan and Kandror, 2010).

GSV를 세포 내부에 존재하도록 하는 과정에서의 다른 필수 요소 중 하나로 TUG (Tether containing a UBX domain, for GLUT4)가 있다(Bogan et al., 2003; Yu et al., 2007; Rubin and Bogan, 2009). TUG는 GLUT4에 특이적으로 결합하며, 이 과정은 일차적으로는 GLUT4의 세포질 쪽 고리에 의하여 매개되고(Yu et al., 2007), 이차적으로는 GLUT4의 N-말단이 이 결합에 관여한다(Bogan et al., 2003). 또한 TUG가 세포 내에서 GLUT4와 같은 위치에 존재한다는 점을 고려할 때, TUG는 GSV에 존재하는 GLUT4에 특이적으로 상호 작용할 것으로 예상된다. 이 상호 작용에는 TUG의 N-말단과 중심 부분이 관여하고, TUG의 C-말단은 직접적으로 GLUT4와의 상호 작용에는 관여하지 않으나 GLUT4를 세포 내에 유지시키는 데에 필수적인

요소이며, 이 부분은 앵커링 단백질(anchoring protein)과 상호 작용하여 GLUT4를 세포 내에 고정시키는 역할을 담당할 것으로 추측된다(Bogan et al., 2003). 실제로 TUG의 C-말단 조각을 첨가하였을 경우 인슐린의 자극이 없는 상태에서도 GLUT4가 인슐린 자극 시와 비슷한 정도의 양으로 세포막으로 이동하는 양상을 확인할 수 있었는데, 이는 첨가한 TUG의 C-말단 조각이 앵커링 단백질의 결합 부위와 상호 작용하면서, 세포 내에 존재하는 TUG 및 이와 연결된 GLUT4가 세포 내에 존재하는 것을 방해하였기 때문으로 해석할 수 있다(Yu et al., 2007). 또한 이러한 양상이 트랜스페린 수용체에서는 나타나지 않는다는 점도 위의 가설을 뒷받침하는 결과이다(Bogan et al., 2003; Yu et al., 2007).

인슐린은 지방 세포 및 근육 세포를 자극하여 TUG와 GLUT4의 결합을 해리시켜, GLUT4를 포함한 GSV를 세포막으로 이동시키는 역할을 한다(Bogan et al., 2003; Schertzer et al., 2009). TUG의 UBX (Ubiquitin-like) 도메인은 세포 내에서 다양한 역할을 하는 ATPase인 p97/CVP/cdc48과 결합하는 것으로 잘 알려져 있으며(Alexandru et al., 2008; Schuberth and Buchberger, 2008), 이 p97은 단백질 복합체를 분해하기 위하여 프로테아솜(proteasome)으로 유도하는 역할을 주로 담당한다. 이러한 점을 고려할 때, 인슐린 자극이 존재할 경우 p97이 TUG-GLUT4 복합체에 대해서도 동일한 작용을 하여 결합을 해리시킬 것으로 추정된다(Bogan and Kandror, 2010). 또한 Ubc9 (Ubiquitin carrier protein 9)과 Daxx (Death associated protein 6)가 GLUT4에 결합하여 GSV의 세포 내 이동을 조절할 것으로 예상되나(Giorgino et al., 2000; Lalioti et al., 2002; Liu et al., 2007), 아직 각각의 역할 및 p97과의 관계에 대해서는 명확히 밝혀진 바가 없다.

1.1.5 인슐린의 자극에 의한 신호 전달 체계

앞 단락에서 기술한 바와 같이, 인슐린은 근육 및 지방 세포에서 GLUT4의 세포막으로의 이동을 촉진시키며, 근육 세포에서는 운동 역시 GLUT4의 세포막으로의 이동을 촉진시킨다. 이 과정은 GLUT4의 전사나 번역 과정과는 무관하게 일어난다(Rose and Richter, 2005; Herman and Kahn, 2006). 그러나 인슐린과 운동은 서로 다른 세포 내 신호 전달 체계를 거쳐서 GLUT4의 이동에 관여한다(Figure 1.4). 혈액 내로 분비된 인슐린은 지방 세포 또는 근육 세포 표면에 존재하는 인슐린 수용체에 결합한다. 인슐린 수용체는 알파 소단위 2개와 베타 소단위 2개가 결합하여 구성된 티로신 인산화효소 수용체(tyrosine kinase receptor)의 일종으로, 세포 외부의 수용체 부위에 인슐린이 결합할 경우 구조적 변화를 일으켜 세포 내부 도메인에 존재하는 티로신 인산화효소를 활성화시킨다(Ottensmeyer et al., 2000). 이에 의하여 IRS(Insulin receptor substrate)가 인산화되어 활성화되며, 이 과정에서 IRS의 N-말단에 위치한 PH 도메인이 IRS를 인슐린 수용체에 근접시키고, PTB 도메인이 IRS를 활성화된 인슐린 수용체와 결합시키는 역할을 한다(Voliovitch et al., 1995). 이러한 과정을 거쳐 IRS가 활성화되면, IRS의 C-말단의 SH2 도메인이 PI3K (Phosphatidylinositol-3-kinase)의 85kDa 소단위와 결합하고, 이는 PI3K의 110kDa 소단위를 활성화시킨다(Myers et al., 1992; Downes et al., 2005). 활성화된 PI3K는 두 개의 단백질 인산화 효소인 Akt와 aPKC- λ/ξ (Atypical protein kinase C- λ/ξ)를 각각 활성화시킨다. 첫 번째로, PI3K는 PI(4,5)P₂ (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)를 인산화시켜 PI(3,4,5)P₃ (Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate)으로 전환시킨다. PI(3,4,5)P₃는 Akt를 세포막 근처로 유도하고, 이후에 PDK1 (3-Phosphoinositide-dependent kinase)이 작용하여 Akt의 Thr-308/309를 인산화 함으로써

활성화시킨다(Filippa et al., 2000). 이러한 과정이 일어나기 위해서는 Akt의 Ser-473/474 인산화가 필수적으로 선행되어야 함이 확인되었고, Akt가 완전하게 활성화되기 위해서는 이 두 과정이 모두 일어나야 하며(Filippa et al., 2000), 후속 연구에서 Rictor-mTOR (Mammalian target of rapamycin) 복합체가 Ser-473의 인산화를 촉진한다는 것이 밝혀졌다(Sarbassov et al., 2005). 두 번째로 PI3K는 PDK1의 도움을 받아 aPKC- λ/ξ 의 활성화 고리에 위치하는 Thr-410의 인산화를 촉진시키며(Bandyopadhyay et al., 1999), 이후 turn 모티프에 위치하는 Thr-560의 자가인산화(autophosphorylation)가 일어나는 동시에, 인산화 여부와 무관하게 구조의 변화가 일어나면서 자가억제(autoinhibition) 기능이 소실되는 과정을 거쳐서 aPKC- λ/ξ 는 완전히 활성화된다(Standaert et al., 1999). 이러한 과정을 거쳐 활성화된 Akt와 aPKC- λ/ξ 는 GLUT4의 세포 내부에서의 이동 조절 및 세포막으로의 이동 조절에 모두 관여한다.

위의 과정을 거쳐 활성화된 Akt는 AS160 (Akt substrates of 160kDa)을 인산화시킨다. AS160은 N-말단에 2개의 PTB (Phosphotyrosine-binding) 도메인이 위치해 있고, C-말단에 Rab 단백질과 상호 작용을 하는 Rab GAP (Rab GTPase-activating protein) 도메인을 가지고 있으며, Akt에 의하여 인산화가 일어나는 RXRXXS/T 모티프를 여러 개 가지고 있다(Figure 1.5)(Kane et al., 2002). 실제로 인슐린 자극 시에, AS160의 RXRXXS/T 모티프 중 5부위(Ser-318, Ser-570, Ser-588, Thr-642, Thr-751)에서 인산화가 일어남이 확인되었으며(Sano et al., 2003), 이는 GAP 도메인의 불활성화를 유발하고, 결과적으로 Rab 단백질에 결합된 GTP의 가수 분해를 억제하여 활성 상태로 유지함으로써 GLUT4의 이동을 촉진한다.

인슐린에 의한 신호 전달 과정은, 위에서 서술한 AS160을

경유하는 것 이외에 한 가지 경로가 더 있다고 알려져 있다(Ribon and Saltiel, 1997; Liu et al., 2003). Cbl (Casitas b-lineage lymphoma)과 어댑터 단백질(adaptor protein)인 CAP (c-Cbl-associated protein)는, APS (Adaptor molecules containing pleckstrin homology (PH) and Src homology 2 (SH2) domains)에 의하여 인슐린 수용체 근처로 이동된다(Ribon et al., 1998; Liu et al., 2002). 인슐린 수용체에 의하여 Cbl의 티로신 잔기가 인산화되면, Cbl은 구아닐 뉴클레오티드 교환 인자(guanyl nucleotide exchange factor)인 C3G와 함께 어댑터 단백질인 CrkII (CT10 regulator of kinase protein II)를 지질 뗏목(lipid rafts)으로 이동시킨다(Chiang et al., 2001). 결과적으로 C3G는 지질 뗏목에 존재하는 GTP-결합 단백질인 TC10을 활성화시킨다(Watson et al., 2001). 이들 신호 전달 단백질들이 지질 뗏목 내부에서 공간적 구획화를 이루고 있는 것은 인슐린 자극에 의해서 GLUT4가 세포막으로 이동하는 과정에 필수적인 것으로 생각된다. 실제로 CAP에 돌연변이가 발생하였을 경우에는, Cbl을 지질 뗏목으로 이동시키는 과정에 문제가 발생하여, 인슐린에 의한 신호 전달이 일어나지 않는 것으로 밝혀졌다(Baumann et al., 2000). 최근 연구에 의하면, TC10이 액틴 역학(actin dynamics)의 조절에 일정 역할을 담당하는 것으로 알려졌으며(Kanzaki and Pessin, 2001; Jiang et al., 2002; Chunqiu Hou and Pessin, 2003; Inoue et al., 2003), 후속 연구에서 TC10의 2개의 동형 단백질 (TC10 α , TC10 β) 중 TC10 α 가 GLUT4의 세포막으로의 이동 과정에 관여하는 것으로 확인되었다(Chang et al., 2007; Okada et al., 2008). 특히, 액틴 조절과 관련된 N-WASP (Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein), Arp3 (Actin related protein-3), 그리고 엑소시스트 단백질 복합체(exocyst protein complex)가 TC10 α 의 신호를 전달받는 단백질들로 알려져 있다(Jiang et al., 2002; Inoue et al., 2003). N-WASP와 Arp3는 액틴의 중합 반응을 조절하고, 엑소시스트 단백질 복합체는 GSV가 세포막에 견인되어

도킹되는 과정을 조절한다. 이러한 상호 작용은 SNARE 단백질들(SNAP-23, syntaxin-4, Synip, Munc18c, VAMP2)에 의하여 GSV와 세포막이 융합되는 과정에 필수적이다. 이 과정에 대해서는 1.1.6에서 더 자세히 서술할 예정이다.

1.1.6 액틴 역학에 의한 GSV 유도

이번 절에서는, 1.1.5에서 서술한 경로에 의해서 신호를 전달받은 GSV가 실제로 어떠한 세포 내 메커니즘을 이용하여 이동 및 세포막과의 융합 과정을 거치는지에 대해 언급하고자 한다. 지금까지 수행된 연구 결과를 종합하여 보면, GSV가 짧은 거리를 이동하는 데에는 액틴이 관여하고, 긴 거리를 이동하는 데에는 미세소관이 관여하는 것으로 알려져 있다(Brozinick et al., 2007; Zaid et al., 2008; Eyster and Olson, 2009). 실제로 미세소관은 인슐린의 자극이 없는 기저 상태에서 GSV가 세포 내에 분포하는 데에는 관여하지만, 인슐린의 자극에 의한 GLUT4의 세포막으로의 이동에는 관여하지 않는다(Eyster et al., 2006). 예를 들면, 기저 상태에서는 GSV가 세포막 아래를 따라 긴 거리를 이동하는 양상이 관찰되며, 그들의 궤적은 세포막 전체에 광범위하게 퍼져 있는 양상을 보인다(Xu et al., 2007). 반면에 인슐린 자극이 가해졌을 때에는 GSV의 이러한 긴 움직임이 중단되고, GSV와 세포막 간의 견인, 도킹, 그리고 융합이 관찰된다(Lizunov et al., 2005). 최근 연구 결과들은 인슐린의 자극에 의해서 GSV의 움직임이 바뀌는 이러한 양상이, 세포막 아래에 있는 미세소관과 액틴의 접합부에서 일어난다는 주장을 뒷받침하고 있다.

인슐린이 액틴 필라멘트를 그물망의 형태로 급격하게 리모델링하도록 유도하고, 이 그물망은 지방 세포 및 근육 세포 모두에서 GLUT4의 세포막으로의 이동에 필수적이라는 사실은 이미 잘 알려져 있다(Brozinick et al., 2007). 예를 들면, 액틴 필라멘트를

세포 내 구조와 연결시키는 데에 필요한 ACTN4 (Alpha-actinin-4)라는 단백질은 인슐린 자극 시에 GLUT4를 세포막으로 이동시키는 데에 필요하다(Talior-Volodarsky et al., 2008). 인슐린의 자극을 받은 ACTN4는 액틴 필라멘트를 따라 GLUT4와 동일한 위치에 존재하며, 이는 ACTN4가 GSV를 액틴 세포골격에 견인하는 데에 일정 역할을 담당할 가능성이 있음을 시사한다. 액틴 그물망의 견인 기능은, 세포막에 존재하는 SNARE 복합체와 GSV에 존재하는 VAMP2 (Vesicle associated membrane protein 2)에 의해서 이루어지는 GSV와 세포막 간의 도킹 및 융합의 최종 단계에 일정 역할을 담당할 것으로 예상된다(Watson and Pessin, 2007). 이러한 연구 결과를 종합하여 보면, ACTN4가 GSV를 인슐린에 의해서 조직된 액틴 그물망으로 유도함으로써, SNARE 복합체에 의한 도킹 메커니즘과 연결되도록 촉진하는 역할을 담당하는 것으로 결론을 내릴 수 있다. 그러나 ACTN4가 견인 및 도킹 과정에서 담당하는 상세한 역할 및 중요성에 대해서는 아직 명확히 알려져 있지 않다.

지방 세포에서는, 진화적으로 보존되어 있는 견인 복합체인 엑소시스트 복합체가 GSV를 세포막의 특정 부위로 유도하는 역할을 한다(Inoue et al., 2003; Inoue et al., 2006). 8개의 소단위로 구성되어 있는 이 복합체는, 세포 외로 배출되는 소포와 그 융합 대상이 되는 세포막의 특정 부위를 처음 인식하는 과정에 관여한다. 지방 세포에서 GSV 엑소시스트 복합체는 세포막의 지질 뿔목 부위에서 조립되며, 그 과정에서 1.1.5에 서술한 대로 인슐린에 의한 TC10 α 의 활성화가 필요하다. 활성화된 TC10 α 는 엑소시스트 복합체의 구성 요소인 Exo70, Sec6, Sec8을 구성하는 과정을 조절한다(Inoue et al., 2006). 흥미로운 사실은, TC10 α 의 활성화가 F-액틴 (filamentous actin, F-actin) 을 재조직하는 데에 필수적이라는 것이다. 인슐린은 AS160에 위치한 Rab GAP 도메인의 활성을

억제시켜 GSV의 이동을 촉진하고, Rho GTPase인 TC10 α 를 활성화시켜 GSV가 세포막의 특정 부위에 도착할 수 있도록 유도할 뿐만 아니라, GSV와 연관되어 있는 Ral GTPase인 RalA를 활성화시킴으로써 세포막에 인접하여 있는 엑소시스트 복합체와 GSV가 연결되도록 한다(Chen et al., 2007). 여기에서 RalA는 GSV의 이동 과정에서 분자 모터(molecular motor) 역할을 담당하는 Myo1c와의 상호 작용을 통해, 소포의 이동 및 견인을 집중시키는 역할을 담당한다(Chen et al., 2007; Yip et al., 2008). 한편 Rab 단백질의 활성화와 유사한 양상으로, 인슐린이 RalA에 신호를 전달하는 과정 역시 PI3K에 의하여 매개된다(Chen et al., 2007). PI3K가 Rab 단백질에 신호를 전달하는 과정에서 Akt가 AS160을 활성화시킨다는 사실은 1.1.5에서 언급하였듯이 잘 알려져 있다. 그러나 PI3K가 RalA에 신호를 전달하는 과정에서도 Akt 및 AS160이 관여하는지, 아니면 이외의 다른 단백질이 관여하는지에 대해서는 명확히 알려져 있지 않다.

액틴과 관련해서, α -와 β -fodrin 동형 단백질이 지방 세포막의 지질 뿔목에 풍부하게 존재한다는 사실은 주목할 만하다(Liu et al., 2006). Fodrin은 실 모양의 α - β 이형이량체(heterodimer)를 형성하는 비적혈구계 스펙트린(nonerythroid spectrin)으로, 세포막 아래에서 반복적인 연결망의 형태로 존재하며, 양 끝이 액틴에 결합되어 있다. 흥미로운 것은, α -fodrin과 syntaxin-4는 쥐의 지방 세포에서 동일한 위치에 존재하면서 상호 작용을 하고, 인슐린이 이러한 상호 작용을 강화시킨다는 사실이다. 이와는 대조적으로, latrunculin A에 의해서 액틴이 파괴될 경우에는 α -fodrin과 syntaxin-4 사이의 상호 작용이 감소하고, α -fodrin의 리모델링 및 GLUT4의 세포막으로의 이동이 억제된다. 이러한 사실로부터, fodrin과 액틴의 연결망은 GSV의 VAMP2를 syntaxin-4에 접근하도록 허용함으로써 GSV와 세포막이

융합되도록 하는 데에 핵심적인 역할을 담당함을 알 수 있다. 만약 인슐린의 자극에 의해서 α -fodrin의 리모델링이 발생하게 되면, GLUT4의 세포막으로의 이동 과정은 latrunculin A의 영향을 받지 않게 되어, 결과적으로 GSV의 외포작용이 일어나게 된다(Liu et al., 2006).

이번 절의 내용을 요약하자면 다음과 같다. 인슐린 자극에 의한 GSV의 이동은 RalA 및 TC10 α 에 대한 인슐린의 신호 전달이 필수적이다. RalA의 활성화가 GSV를 세포막의 지질 뗏목에 위치한 엑소시스트 복합체로 견인하기 위해 이동시키는 과정을 촉진하는 반면에, 활성화된 TC10 α 는 GSV의 견인에 필요한 엑소시스트 복합체의 형성을 조절하고, GSV의 도킹에 필요한 F-액틴을 재조직한다. 또한, fodrin은 synyaxin-4와의 상호 작용을 통해서 엑소시스트 복합체에 견인된 GSV를 세포막의 특정 부위에 위치하여 있는 SNARE 도킹 기구로 이동시키는 과정에 관여할 것으로 예상된다.

1.1.7 세포막의 지질층과 GSV의 융합과의 관련성

세포막 아래에 있는 액틴 필라멘트의 그물망이 GSV의 여정 중에서 견인 및 도킹 과정에 중요한 역할을 담당하는 것은 분명하다. 그에 더해서, 인슐린의 자극에 의한 세포막 지질층의 변화가 GSV와 세포막의 융합을 촉진시킨다는 증거가 밝혀지고 있다. 세포막의 지질층은 포도당 대사 이상과 관련된 질병에서 병태생리의 핵심을 담당하는 요인이기 때문에, 이 지질층이 인슐린의 작용과 GLUT4의 세포막으로의 이동 과정에 어떠한 역할을 하는지에 대한 연구가 각광을 받고 있다. 실제로 현미경을 이용한 몇몇 세포막 연구로부터, 인슐린에 의하여 GSV와 세포막 간의 융합 과정에 새로운 시사점을 제공해 주는 결과들이 도출되고

있다.

포낭(caveolae)은 세포막의 다른 부위와는 형태적으로 차이가 있는 스핑고지질-콜레스테롤 미세도메인(sphingolipid-cholesterol microdomain)의 형태를 갖추고 있으며, 이는 포낭 단백질에 의하여 안정화된(Parton and Simons, 2007). 수 년 동안, 포낭이 인슐린과 GLUT4에 미치는 영향 및 담당하는 역할에 대해서 많은 가설이 제기되었다. 포낭의 구조를 연구하는 과정에서 사용된 수많은 접근 전략이 내포하는 여러 가지 문제점으로 인하여 결과의 해석에는 주의가 필요함에도 불구하고, TC10 α 와 엑소시스트 복합체의 포낭을 기반으로 한 견인 및 F-액틴의 분산 매커니즘은 포낭과 액틴의 연관성을 증명해 주고 있다(Kanzaki and Pessin, 2002; Foti et al., 2007). 형광 물질로 포낭과 F-액틴을 표지한 결과, 액틴 필라멘트가 포낭의 미세도메인으로부터 나온다는 사실이 확인되었다(Kanzaki and Pessin, 2002). 포낭과 연결되어 있는 F-액틴 구조인 이 Cav-액틴(Caveolin-associated filamentous actin, Cav-actin)을 latrunculin B나 TC10의 돌연변이(TC10/T31N)로 파괴할 경우에는 군집된 포낭의 조직화에 영향을 주지 못하였다. 그러나, 군집된 포낭을 methyl-beta-cyclodextrin으로 파괴할 경우에는 Cav-액틴 구조가 분산되는 결과가 나타났다(Kanzaki and Pessin, 2002). 추후에 정량 전자현미경과 동결할단법(freeze-fracture method)을 이용한 분석 결과, 액틴을 비롯한 세포골격의 구성 요소들은 포낭의 목 부위에 위치한 세포막에 풍부하게 존재한다는 사실이 밝혀졌다(Foti et al., 2007). 이를 종합하면, 포낭은 F-액틴의 조직화에 일정 역할을 담당하고 있음을 알 수 있다. 인슐린에 의한 GLUT4의 이동 과정에서 F-액틴이 갖는 명백한 중요성을 고려하여 볼 때, 이러한 연구 결과는 GLUT4의 조절 과정에서 포낭의 중요성 또한 강조하고 있다고 볼 수 있다. Cav-액틴 구조의 조절과 관련되어서 흥미로운 것은,

전자현미경을 이용한 후속 연구에서 포낭의 가장자리에 PIP2가 높은 농도로 관찰되었다는 점이다(Fujita et al., 2010). PIP2가 이곳에서 국소화되어 있다는 것은, 세포막과 세포골격의 상호작용, 그리고 F-액틴의 안정성을 조절하는 데에 지질 뗏목이 필요하다는 사실과 부합하는 연구 결과이다(Kwik et al., 2003). 흥미로운 것은, 고인슐린혈증으로 인한 GLUT4 이동의 장애로 인하여 인슐린 저항성이 유발된 지방 세포 및 근육 세포에서는 세포막의 PIP2와 F-액틴이 감소하여 있으나, F-액틴의 구조와 인슐린 자극에 의한 GLUT4의 세포막으로의 이동 과정은 외부로부터 PIP2를 세포막에 첨가하였을 때에 원상태로 회복되었다는 것이다(Chen et al., 2004; McCarthy et al., 2006).

GLUT4의 조절에 관한 세포막의 기능성에 대한 실험적 증거들에 덧붙여서, 최근 연구에서는 GSV와 GLUT4의 조절 양상을 정확히 평가하기 위하여 전반사 형광 현미경(total internal reflection fluorescence microscopy)을 도입하였다. 이 현미경은 세포막에 인접하여 있는 세포의 제한된 영역 안에서, 선택적으로 빛을 비추어 형광 물질을 활성화시키기 위하여 소멸파(evanescent wave)를 사용한다. 후속 연구에서는 이를 이용하여 기존 연구 결과를 확장하였고, 그 결과 세포막의 일부분이 인슐린에 의해 활성화되는 과정이 GSV와 세포막의 융합 과정에 필수적이라는 사실을 밝혀 내었다(Koumanov et al., 2005). 예를 들어 전반사 형광 현미경을 이용한 몇몇 연구에서는, 세포막과 GSV가 융합할 수 있도록 준비시키는 중요한 세포막 신호의 존재에 대한 강력한 증거를 제시하고 있다(Gonzalez and McGraw, 2006; Bai et al., 2007; Jiang et al., 2008). PI3K와 Akt의 활성을 억제하고 분석한 결과, Akt는 인슐린 자극에 의한 GSV와 세포막 간의 융합 전 단계(모집, 견인, 도킹)를 조절하는 중요한 역할을 담당할 것으로 예상되었다(Gonzalez and

McGraw, 2006). 이와는 대조적으로, 인슐린 자극에 의한 GSV와 세포막의 융합은 Akt의 활성화는 독립적으로 발생하는 것으로 나타났다. 즉, GSV와 세포막 간의 융합 이전 단계는 Akt의 활성을 억제하였을 경우 그 효율이 감소하지만, 세포막에 이미 도킹되어 있는 GSV의 융합 과정은 인슐린에 의하여 변함없이 촉진된다는 것이다. 그러나 wortmannin을 투여했을 경우에는 GSV와 세포막 간의 융합이 억제되었으며, 이는 도킹 이후의 과정이 PI3K의 영향을 받음을 시사한다. 컴퓨터를 이용하여 GSV를 동적 추적(dynamic tracking)한 결과, 인슐린은 PI3K 및 Akt의 신호를 이용하여 GSV와 세포막의 융합 전 단계를 가속화시키지만, GSV와 세포막을 융합시키기 위한 준비 과정에는 다른 신호를 사용한다는 사실이 확인되었다(Bai et al., 2007). 추가적인 분석 과정에서 이 두 번째 신호가 PI3K를 필요로 할 가능성이 제기되었지만, 아직 확실한 결론은 내려져 있지 않다.

GSV와 세포막 간의 융합을 준비하는 과정에서 PI3K가 담당하는 구체적인 역할에 대해서는 추후 연구를 통하여 확인이 필요하다. 그러나 이와 관련하여, PI3K가 PKC- λ/ξ /Munc18c와 PLD1 (Phospholipase D1)에 신호를 전달하여 GSV와 세포막의 융합을 촉진시킬 수 있다는 점은 주목할 만하다(Thurmond et al., 2000; Hodgkinson et al., 2005; Lee et al., 2005). 인슐린의 신호가 PKC- λ/ξ 를 경유해서 Munc18c를 syntaxin-4와 분리시키고, 이는 도킹 이후 및 융합 이전 과정에 필요하다(Thurmond et al., 2000; Hodgkinson et al., 2005). 반면에 인슐린에 의하여 활성화된 PLD1은 융합이 가능한 세포막을 만드는 역할을 담당한다(Huang et al., 2005). PLD1은 지질 포스파티딘산(phosphatidic acid)을 생성하고, 이 물질은 융합 구멍이 생성되고 확장되는 동안 세포막이 구부러지는 과정의 활성화 에너지를 낮추어서 원활한 융합이 이루어지도록 한다(Kooijman et al.,

2003). 요컨대, PI3K는 GSV와 세포막의 도킹 이후에 융합되는 필수적인 기전을 조절하기 위해서 두 개의 서로 다른 신호를 사용한다.

1.1.8 근육의 수축에 의한 신호 전달 체계

근육 세포에서는 1.1.5에서 언급하였던 인슐린의 자극뿐만 아니라, 근육의 수축 역시 AS160의 인산화를 유발하여 GLUT4의 세포막으로의 이동을 촉진한다(Bruss et al., 2005). 그러나 이 과정은 인슐린에 의한 신호 전달 과정과는 다소 다른 경로를 거쳐서 GSV에 작용하는 것으로 알려져 있으며, 아직 완전하게 밝혀져 있지는 않다. 근육의 수축에 의해서 포도당의 수송이 일어나는 기전은, 탈분극에 의하여 근소포체(sarcoplasmic reticulum)로부터 방출된 Ca^{2+} 에 의하여 직접 활성화되는 피드포워드(feed-forward) 신호 전달과, Ca^{2+} 에 의하여 활성화된 근육의 수축 및 이온 펌핑(ion pumping), 그리고 그 결과로 인하여 근육 세포에 가해지는 에너지 자극에 의한 피드백(feedback) 신호 전달로 구분된다. 그러나 이는 실제 신호 전달 경로를 극도로 단순화시킨 설명에 불과하다. 이와 관련해서 현재까지 알려져 있는 사실을 요약하자면 다음과 같다 (Figure 1.6).

근육의 수축과 포도당 수송과의 관계를 알아보기 위한 최초의 연구는, 카페인에 담긴 개구리의 sartorius 근육을 이용하여 수행되었다. 카페인은 근소포체로부터 Ca^{2+} 를 분비시켰고, 이는 포도당 수송의 증가로 이어졌다. 이 연구 결과, 근육이 수축하는 동안 포도당 수송이 증가하는 과정에서는 탈분극은 필요하지 않으며 Ca^{2+} 의 분비만이 필요함을 알게 되었다(Holloszy and Narahara, 1965; Holloszy and Narahara, 1967). 쥐의 근육을 대상으로 실험한 후속 연구 결과에서도, 근육을 수축시키기에 충분하지 않은 농도의

카페인에 담갔던 근육에서 포도당 수송이 증가하는 양상이 관찰되었다(Youn et al., 1991; Wright et al., 2004; Wright et al., 2005). 또한, Ca^{2+} 를 분비시키는 화합물인 N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphtalenesulfonamide를 사용하여 동일한 조건으로 실험했을 때에도 유사한 결과가 나타났다(Youn et al., 1991). 이러한 결과들로 미루어 볼 때, Ca^{2+} 자체만으로도 근육에서의 포도당 수송량을 증가시키기에 충분함을 알 수 있다. 그러나, 몇몇 후속 연구에서 근육의 수축 없이도 카페인이 근육 세포의 에너지를 감지하는 AMPK의 활성도를 증가시키는 현상이 관찰되었다(Jensen et al., 2007; Raney and Turcotte, 2008; Egawa et al., 2011). 후속 연구에서, AMPK의 우성 음성(dominant negative) 돌연변이체를 과발현시켜서 자연 상태의 AMPK의 활성도를 매우 낮춘 상태의 쥐의 soleus 근육을 대상으로 실험하였을 때, 포도당 수송량을 증가시키는 카페인의 능력이 손상된 것이 확인되었다(Jensen et al., 2007). 결론적으로, 카페인 투여 시에 포도당의 수송량이 증가하는 이유는, Ca^{2+} 의 증가 자체가 원인이 아니라, AMPK의 활성화를 거쳐서 근육에 에너지 자극이 가해지기 때문인 것이다. AMPK에 대한 자세한 내용은 이 절의 중반부에 기술할 예정이다.

칼슘은 AMPK가 아닌, 다른 하위 신호 전달 분자들의 활성화를 통해서 포도당의 수송을 증가시키는 것으로 생각되고 있다. 한 가지 가능성은 CaMK (Calcium/calmodulin-dependent protein kinases)에서 찾을 수 있다. 인간의 골격근에는 CaMKII와 CaMKIII, 그리고 상위의 인산화효소인 CaMKK가 높은 정도로 발현되어 있으나, CaMKIV와 CaMKI는 발견되지 않는다(Rose et al., 2005; Rose et al., 2006). 쥐에서는, 다른 CaMK와 CaMKK와 더불어 CaMKI도 발견되고 있다(Jensen et al., 2007; Witczak et al., 2007; Abbott et al., 2009; Abbott et al., 2011). CaMKII의 차단제인 KN62와 KN93이 근육에서

수축에 의한 포도당의 수송을 감소시키는 현상으로 볼 때, CaMKII는 근육의 수축에 의한 포도당 수송에 연관되어 있음이 확인되었다(Macpherson et al., 2002; Jensen et al., 2007). 최근에, CaMKII에 특이적인 억제자를 쥐의 tibialis anterior 근육에 전기천공법(electroporation)으로 주입하였을 때, 근육의 수축에 의한 포도당의 수송이 30% 감소한다는 결과도 보고되었다(Witczak et al., 2010). 그러나 근육의 수축을 차단함으로써 에너지 소모를 막았을 경우에는, 근육 내 칼슘 농도가 증가한다고 해도 포도당의 수송량은 거의 증가하지 않았다(Jensen and Richter, 2010). 이를 분석하여 보면, 근육이 수축하는 동안의 포도당 수송의 증가는 주로 에너지를 감지하는 신호 전달 경로를 활성화시키는 에너지 사용에 기인하며, Ca²⁺은 단지 간접적인 효과만을 담당할 뿐임을 알 수 있다.

일산화질소 합성효소(nitric oxide synthase)는 근육 세포에 발현되며, 근육이 수축할 경우에 효소의 활성 및 일산화질소(nitric oxide)의 생성이 증가한다. 설치류를 대상으로 한 실험 결과, 이 효소가 근육의 수축에 의한 포도당 수송 과정에 관여하는지에 대해서는 결과가 일관적이지 않다. 몇몇 연구에서는 일산화질소 합성효소의 작용을 억제하더라도 근육의 수축에 의한 포도당 수송량을 감소시키지 못한다고 주장하였으며(Etgen et al., 1997; Higaki et al., 2001; Rottman et al., 2002), 다른 몇몇 연구에서는 포도당 수송량의 감소가 확인되었다(Balon and Nadler, 1997; Roberts et al., 1997; Stephens et al., 2004; Merry et al., 2010). 특히 후자의 연구 중 하나에 대해 자세히 살펴보면, 일산화질소 합성효소를 억제하였을 경우에 오직 속근(fast-twitch muscle)인 EDL (extensor digitorum longus) 근육에서만 포도당 수송량의 감소를 가져왔고, 지근(slow-twitch muscle)인 soleus 근육에서는 이러한 효과가 관찰되지 않았다(Merry et al., 2010). 이것은 아마도 일산화질소 합성효소가 soleus

근육보다는 EDL 근육에 더 많이 발현되어 있는 것과 관계가 있을 가능성이 높으며, 결론적으로 일산화질소가 근육의 수축 시에 포도당 수송에 미치는 영향은 근섬유의 유형에 따라 다를 수 있다는 점을 시사한다.

활성 산소(reactive oxygen species) 또한 근육의 수축 시에 포도당의 수송 기전을 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 운동 중에는 활성 산소의 생성량이 증가하며(Reid, 2008), 골격근을 과산화수소에 담갔을 경우에는 포도당의 수송량이 증가하였다(Jensen et al., 2008). 반면에, 쥐의 EDL 근육을 활성 산소 제거제인 NAC(N-acetylcysteine)에 담갔을 때에는 근육 수축에 의한 포도당 수송량이 감소하였다(Sandstrom et al., 2006; Merry et al., 2010). 이러한 효과가 AMPK 유전자를 억제한 근육과 그렇지 않은 정상 근육에서 동일하게 나타나는 것으로 미루어 볼 때, NAC의 효과는 AMPK와 무관한 것으로 결론을 내릴 수 있다. 그러나 이러한 종류의 자극은 생리적인 수축 과정을 거의 반영하지 못한다는 단점이 있다. 자극의 강도를 약하게 하였을 때에는, NAC는 활성 산소의 생성을 감소시켰음에도 불구하고 포도당 수송량의 감소 효과를 나타내지 못하였다(Merry et al., 2010). NAC를 인간에게 주사하였을 경우 역시, 운동에 의한 포도당 수송량이 감소하는 효과는 관찰되지 않았다(Merry et al., 2010). 종합하면, 생체 외에서 아주 강한 전기적 자극을 가하였을 경우에는 활성 산소가 근육의 포도당 수송에 관여하지만, 생리적인 운동이 일어나는 동안 활성 산소의 중요성은 상대적으로 떨어진다고 결론을 내릴 수 있다.

근육이 수축하는 동안, 근육의 에너지 전하는 운동의 강도와 시간에 비례하여 감소한다. 그 결과 크레아틴 인산(creatine phosphate) 농도가 감소하고, 강렬하거나 장시간의 운동을 할 경우에는 ATP의 농도도 감소한다. 반면에, 크레아틴(creatine) 과 AMP의 농도는

증가한다(Broberg and Sahlin, 1989). 이러한 변화에 의해서 세포의 에너지 감지기인 AMPK가 활성화된다(Hardie, 2007). AMPK는 촉매 작용을 하는 α -소단위와 조절 역할을 하는 β - 그리고 γ -소단위로 구성되어 있는 이형삼량체 효소(heterotrimeric enzyme)이다. α - 와 β -소단위는 각각 두 개의 동형 단백질($\alpha 1$, $\alpha 2$; $\beta 1$, $\beta 2$)이 존재하며, γ -소단위는 세 개의 동형 단백질($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$)이 존재한다.

골격근이 운동을 하는 동안에는, γ -소단위에 AMP와 ADP의 결합이 증가하고, ATP의 결합이 감소하면서 AMPK의 생리적인 활성화가 일어난다. 인간의 골격근에서는, AMPK의 삼량체의 구성이 세 가지 복합체에 국한되어 있다. $\alpha 2\beta 2\gamma 1$ 과 $\alpha 1\beta 2\gamma 1$ 이 전체의 80% 가량을 차지하며, $\alpha 2\beta 2\gamma 3$ 이 나머지 20% 가량을 차지한다(Wojtaszewski et al., 2005). 흥미로운 것은, $\alpha 2\beta 2\gamma 3$ 복합체는 골격근에 특이적으로 존재하며(Wojtaszewski et al., 2005; Birk and Wojtaszewski, 2006), 운동 시에 주로 활성화되는 것은 $\alpha 2\beta 2\gamma 3$ 복합체라는 점이다(Birk and Wojtaszewski, 2006). $\alpha 2\beta 2\gamma 1$ 복합체는 운동이 지속될 경우에만 활성화되며, $\alpha 1\beta 2\gamma 1$ 복합체는 운동 중에 전혀 활성화되지 않거나 아주 약간 활성화되는 정도에 그쳤다(Trebbak et al., 2007).

위 과정을 통하여 활성화된 AMPK는 AS160 및 TBC1D1을 인산화시켜 궁극적으로 GLUT4의 세포막으로의 이동을 촉진한다. 1.1.5에서도 언급하였듯이 AS160은 지방 세포에서 인슐린에 의한 신호를 연결하여 GLUT4를 이동시키는 핵심 단백질로 확인된 바 있다(Kane et al., 2002; Sano et al., 2003). 이 때에 주목할 만한 사실은, 근육이 수축을 하는 동안에는 1.1.5에서 언급하였던 인슐린에 의한 신호 전달 경로 중 근위부의 경로는 일반적으로 활성화되지 않는다는 점이다. 골격근과 관련된 최근 연구 결과에 의하면, Akt 이하의 신호 전달 경로에서는 인슐린에 의한 경로와 근육의 수축에

의한 경로가 하나로 수렴되는 것으로 밝혀졌다. 골격근에서 이와 같은 수렴이 일어나는 지점은 AS160과, 그리고 이와 유사한 아미노산 서열 및 도메인 구조를 가지고 있는 TBC1D1이다.

TBC1D1은 AS160과 아미노산 서열이 50% 일치하고, PTB 도메인 및 Rab GAP 도메인 등 유사한 도메인 구조를 가지고 있으며(Park et al., 2011), AS160과 마찬가지로 Akt에 의해 인산화될 수 있는 장소를 여러 개 가지고 있다(Peck et al., 2009). 그러나 AS160과는 달리 AMPK에 의해 인산화될 수 있는 장소인 Ser-237이 있고(Taylor et al., 2008), 모든 조직에 비슷한 정도로 분포하는 AS160과는 달리 골격근에 높은 정도로 발현되어 있다 (Figure 1.5).

그러나 AS160과 비교하였을 때 TBC1D1의 역할이 무엇인지에 대해서는 명확히 알려진 바가 없다. AS160과 TBC1D1은 둘 다 CBD 도메인을 가지고 있다. 근육 수축 과정에서 세포 내 Ca^{2+} 가 증가하면, 이와 결합하는 단백질인 calmodulin이 활성화되어 결과적으로 CBD 도메인이 있는 AS160과 TBC1D1이 근육 수축 동안에 일정 역할을 담당할 것으로 예측하기도 하였다. 실제로 calmodulin이 CBD 도메인에 결합하는 것을 차단하였을 때, 근육의 수축에 의한 포도당 수송량은 40% 가량 감소한 반면 인슐린의 자극에 의한 포도당 수송량은 변화가 없었다(Kramer et al., 2007). 또한, Rab GAP 도메인의 돌연변이가 일어난 AS160의 경우에는 근육의 수축에 의한 포도당 수송량의 감소가 원상태로 회복되었다. 이러한 사실은 CBD가 AS160의 Rab GAP 도메인의 기능을 불활성화시킴으로써 포도당 수송을 유발할 수 있음을 시사한다. 그러나 이러한 작용이 TBC1D1에서도 동일하게 일어나는지에 대해서는 아직 알려진 바가 없다. 최근 한 연구 결과에 의하면, AMPK에 의해 활성화된 TBC1D1은 그 자체로 GLUT4의 세포막으로의 이동을 촉진하는 역할을 담당하기도 하나, 또 다른

경로로 PTB1 도메인의 존재 하에 AMPK에 의해 Ser-237이 인산화되면서 인슐린 반응성을 획득하고, 결과적으로 AS160과 유사한 방식으로 Akt에 의해 Thr-596의 인산화가 일어남으로써 GLUT4의 세포막으로의 이동에 관여한다고 한다(Hatakeyama and Kanzaki, 2013). 그러나 이를 뒷받침하기 위한 후속 연구는 아직 부족한 실정이다. 이번 연구에서는 그 해답을, AS160 및 TBC1D1의 Rab GAP 도메인이 어떠한 Rab 단백질과 상호 작용을 하는지, 그리고 그 결합 친화도는 얼마나 되는지에 중점을 두고 찾고자 한다. 이를 위하여, 우선 Rab 단백질에 대하여 지금까지 연구된 바를 정리하면 다음과 같다.

Rab 단백질은 다양한 세포 내부에서 막 단백질의 이동에 관여하는 G단백질로 인간에서는 63종류 이상이 존재하며(Zerial and McBride, 2001), 이 중에서 인슐린의 자극에 의한 GLUT4의 세포 내 이동에 관여할 것으로 예상되는 Rab 단백질로 Rab4, Rab5, Rab8A, Rab10, Rab14 등이 제시되었다(Cormont et al., 2001; Huang et al., 2001; Ishikura et al., 2007; Sano et al., 2008). 이 중에서 Rab10은 지방 세포에서 GSV와 결합하여 세포막까지 같이 이동하는 유일한 Rab 단백질로 확인되었고(Chen and Lippincott-Schwartz, 2013), Rab14는 재활용을 위해 세포막에서 분류 엔도솜으로 이동한 GLUT4를 TGN으로 이동시키는 역할을 담당한다(Reed et al., 2013). 근육 세포에서는 Rab10 대신에 Rab8A가, GSV를 동적 유지(dynamic retention) 상태로부터 해방시켜서 세포의 말초 부위로 이동할 수 있도록 만드는 역할을 할 것으로 예상되고 있다(Ishikura et al., 2007; Randhawa et al., 2008). 그러나 각 Rab 단백질들이 GLUT4의 세포 내 이동에 구체적으로 어떻게 관여하는지는 밝혀지지 않았으며, TBC1D1과 상호 작용하는 Rab 단백질이 AS160과 동일한지, 아니면 다른 Rab 단백질인지에 대해서도 알려지지 않았다. 생체 외에서

AS160 및 TBC1D1의 Rab GAP 도메인의 GSV 내 Rab 단백질들에 대한 활성도를 측정한 결과, 둘 모두 Rab2A, Rab8A, Rab8B, Rab10, Rab14가 기질로 작용할 가능성이 높음이 확인된 적은 있으나(Miinea et al., 2005; Roach et al., 2007), 생체 내에서의 연구 결과를 포함하여 이를 뒷받침하는 후속 연구는 아직 미흡한 실정이다.

1.2 연구의 필요성

제2형 당뇨병의 주된 병태생리인 인슐린 저항성이 발생하는 기전에 대해서는 아직 명확하게 밝혀지지 않은 부분이 많다. 특히 인슐린 저항성과 관련된 세포 내 신호 전달 경로에 관여하는 여러 단백질 중에서, GLUT4의 세포막으로의 이동에 관여할 것으로 예상되는 단백질인 TBC1D1의 역할에 대해서는 아직 명확히 알려진 바가 없으며, 이 과정에서 TBC1D1의 Rab GAP 도메인이 어떠한 Rab 단백질과 상호 작용을 하는지에 대해서도 확인된 바가 없다. 특히 1.1.8에서 언급하였듯이, AS160이 인슐린의 자극 및 근육의 수축에 의해 활성화되어 GLUT4의 이동에 관여함에도 불구하고, 근육 세포에서 TBC1D1이 별도로 존재하는 생물학적 의미에 대해서 고찰해 볼 필요가 있다. 이에 대하여 연구함으로써 근육 세포 내의 GLUT4 이동과 관련된 신호 전달 경로를 정확히 밝혀내는 것은, 당뇨병의 근본적 원인을 규명하고 치료 전략을 개발하는 데에 도움이 될 가능성이 높다. 예를 들면, 제2형 당뇨병 환자를 대상으로 유전자 검사를 실시하였을 때, 만약 특정 유전자에 이상이 발견될 경우 해당 유전자를 대상으로 한 맞춤형 약물 치료나 유전자 치료를 시행함으로써, 당뇨병에 대하여 보다 더 근본적이고 효율적인 치료를 시행할 수 있을 것으로 사료된다.

1.3 연구의 목적

따라서 이번 연구에서는, 주로 근육 세포 내에 존재하는 TBC1D1의 역할을 규명하는 것을 목표로 하였다. 이와 관련하여 생체 내에서의 실험 연구를 진행하기 이전에, 생명정보학적 기법을 사용하여 AS160 및 TBC1D1의 Rab GAP 도메인의 기질로 어떠한

Rab 단백질들이 작용하는지를 분석하고, 상호 작용의 양상에 차이가 존재하는지를 확인함으로써 두 핵심 단백질의 역할에 어떠한 차이가 있을지를 예측해 보고자 한다.

단백질은 대사, 정보 처리, 수송, 그리고 구조 형성 등 세포 기능의 모든 측면에 있어서 중요한 역할을 담당한다. 특히, 단백질 간의 상호 작용은 환경의 변화를 감지하고, 신호 전달을 매개하며, 대사 및 신호 전달과 관련된 효소들의 활성을 조절하고, 세포의 구성을 유지하는 것과 같은 기능을 조절하는 역할을 한다(Braun and Gingras, 2012). 그러나 실험적인 방법만으로는 단백질 복합체의 3차원 구조를 결정하는 데에 기술적인 어려움이 있고 비용이 많이 들기 때문에, 단백질 도킹이 실험적인 방법을 보완할 수 있는 중요한 전산학적 도구로 활용되고 있다(Huang, 2015). 이 단백질 간의 도킹을 정확하게 예측하는 것은 단백질 복합체에 대한 구조적인 지식을 제공함으로써 궁극적으로 기존에 밝혀지지 않은 단백질의 기능에 대한 정보를 추론할 수 있도록 한다. 이번 연구에서는 기존 연구에서 밝혀져 있지 않은 TBC1D1의 Rab GAP 도메인의 기질 특이성을 단백질 도킹 방법을 이용하여 분석하고, 그 결과를 AS160의 Rab GAP 도메인의 기질 특이성 분석 결과와 비교하여 두 단백질의 역할에 어떠한 차이가 있는지를 유추하고자 한다.

본 연구에서 TBC1D1의 역할과 관련하여 입증하고자 하는 가설은 다음과 같다. AS160과 TBC1D1은 다양한 Rab 단백질과 상호 작용을 하고, 그 결과 두 핵심 단백질은 생체 내의 포도당 수송 과정에서 일정 비율만큼의 역할을 담당할 것이라는 추측이다.

만약 이 가설이 참이라고 가정한다면, 전체 Rab 단백질 중에서 AS160과 TBC1D1의 Rab GAP 도메인과 상호 작용하는 Rab 단백질의 비율은, AS160 또는 TBC1D1의 기능이 상실되었을 때에

포도당 수송량이 감소하는 비율과 유사할 것이다. 따라서 AS160 및 TBC1D1 유전자의 발현을 억제시킨 녀아웃 마우스(knockout mouse)에서 포도당 수송량이 어느 정도로 감소하는지를 측정하였던 기존의 연구 결과를 이용한다면, AS160 및 TBC1D1과 여러 가지 Rab 단백질 간의 상호 작용 에너지 중에서 상호 작용 유무를 판단하는 절사점(cutoff value)을 선택할 수 있다. 만약 이렇게 선택된 절사점을 기준으로 하였을 때, AS160 또는 TBC1D1과 상호 작용할 것으로 예상되는 Rab 단백질과, 생체 외에서 수행된 기존 연구에서 AS160 또는 TBC1D1과 상호 작용하는 것으로 밝혀진 Rab 단백질의 종류가 유사하다면, 앞에서 제시한 TBC1D1의 역할에 대한 가설은 참일 가능성이 높다고 결론을 내릴 수 있다.

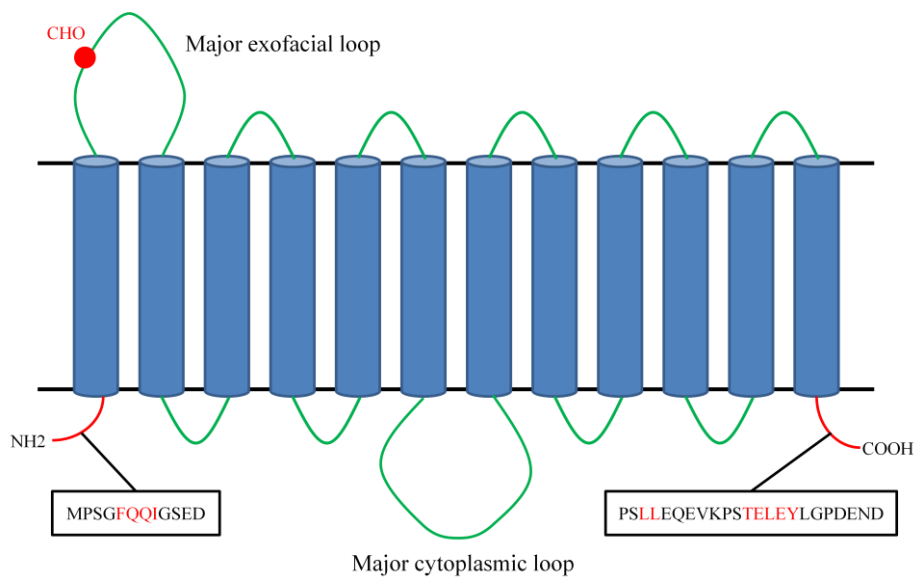


Figure 1.1 Schematic structure of GLUT4 (Glucose transporter 4). The unique sensitivity of GLUT4 to insulin-mediated translocation appears to be derived from sequences shown in the N-terminal (required phenylalanine) and C-terminal (required dileucine and acidic residues) regions. These sequences are likely involved in rapid internalization and sorting of GLUT4 in GSVs (GLUT4 storage vesicles) (Huang and Czech, 2007).

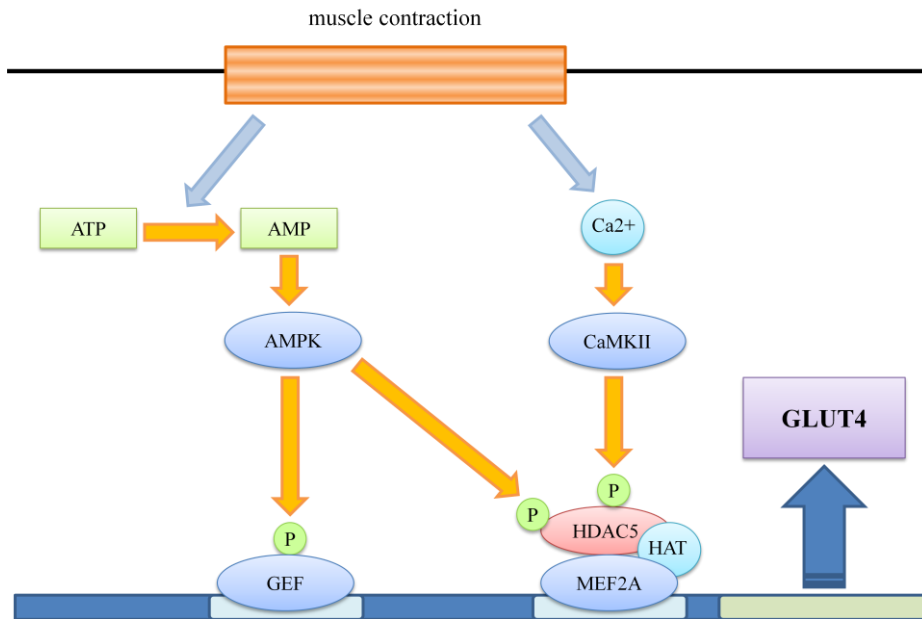


Figure 1.2 The molecular signaling pathways involved in contraction-induced GLUT4 gene activation. Skeletal muscle contraction leads to activation of AMPK (AMP-activated protein kinase) and CaMKII (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II). The activated AMPK phosphorylates GEF (GLUT4 enhancer factor), and HDAC5 (Histone deacetylase 5) are phosphorylated by AMPK and CaMKII. As a result, the activated GEF binds to domain I, and HDAC5 is exported out of the nucleus, which allows MEF2A (Myocyte enhancer factor 2A) to bind to MEF2 domain. Finally, the GLUT4 gene is activated (Richter and Hargreaves, 2013). HAT, Histone acetyltransferase.

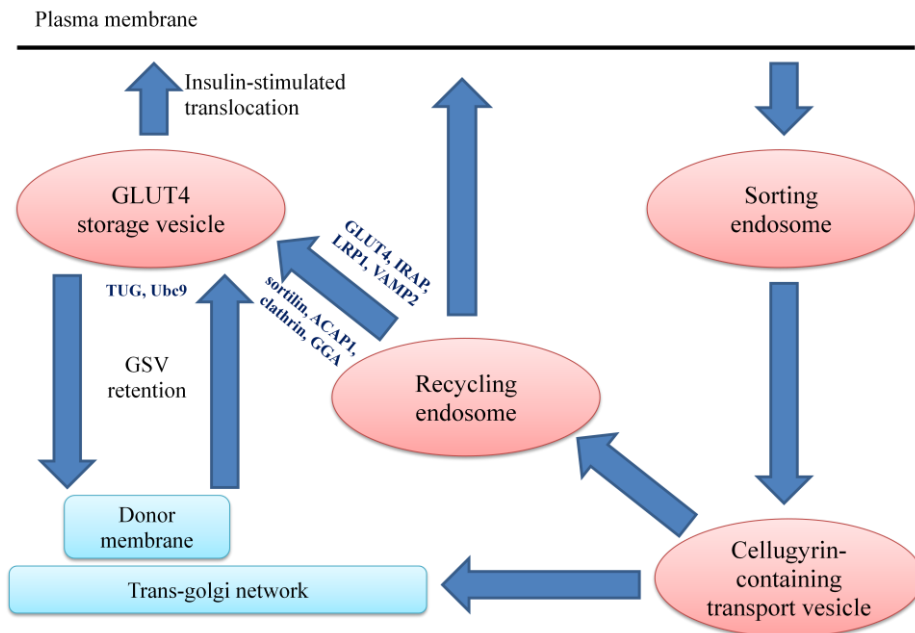


Figure 1.3 A model for intracellular GLUT4 trafficking. In unstimulated cells, GLUT4 is localized predominantly in the perinuclear region in GSVs (GLUT4 storage vesicles). In addition to GLUT4, these vesicles contain IRAP (Insulin-regulated aminopeptidase), LRP1 (Low density lipoprotein receptor-related protein 1), and VAMP2 (Vesicle associated membrane protein 2), and sortilin. The GSVs exist in a dynamic equilibrium with donor membranes that are a subdomain of the TGN (Trans-Golgi network) and recycling endosomes. Formation of the GSVs requires GGA (Golgi-localized, γ -ear-containing, ADP-ribosylation factor-binding proteins), ACAP1 (Arf-GAP with coiled-coil, ANK repeat and PH domain-containing protein 1), and clathrin. Once formed, GSVs are retained intracellularly by TUG (Tether containing a UBX domain, for GLUT4), Ubc9 (Ubiquitin carrier protein 9), and other proteins. When the insulin is added, GSVs move and fuse with the plasma membrane. Meanwhile, The GSV component proteins are internalized into sorting endosomes and returned to donor membranes by cellugyrin-containing transport vesicles (Bogan and Kandror, 2010).

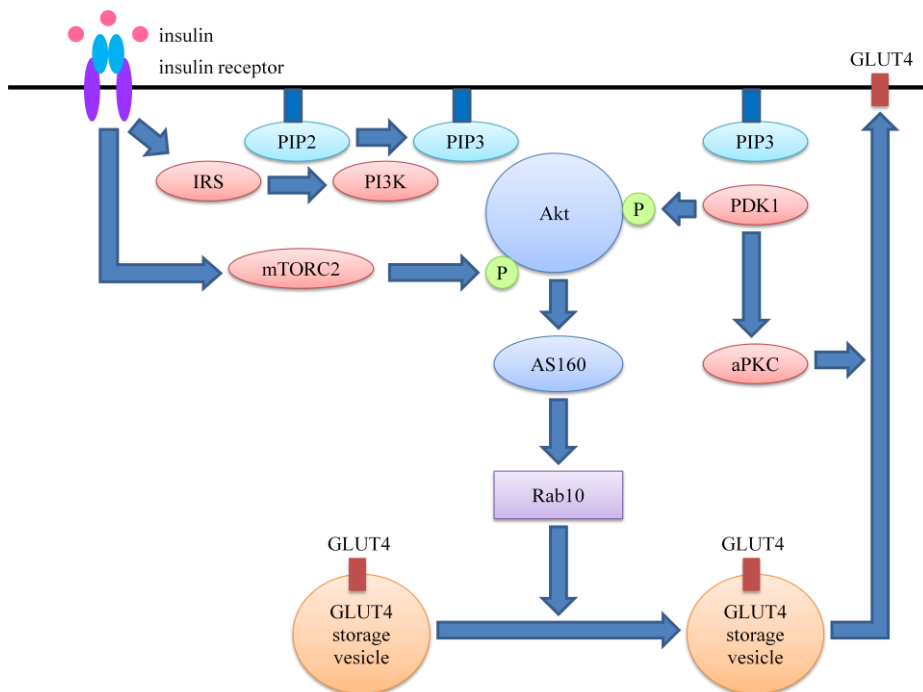


Figure 1.4 Signaling pathways for GLUT4 translocation in adipocytes. Insulin activates Akt mediated by the activation of IRS (Insulin receptor substrate), PI3K (Phosphatidylinositol-3-kinase), PDK1 (3-Phosphoinositide-dependent kinase), and mTORC2 (Mammalian target of rapamycin complex-2). Activated Akt phosphorylates AS160 (Akt substrates of 160kDa), which inhibit Rab GAP (Rab GTPase-activating protein) activity toward particular Rab isoforms (especially Rab10). Inhibition of GAP promotes conversion of less active GDP-loaded Rab to more active GTP-loaded Rab. The more active GTP-loaded Rab then allows GSVs (GLUT4 storage vesicles) to move to and fuse with the plasma membrane. PDK1 also activates aPKC (Atypical protein kinase C), which involves in translocation of GSVs (Sakamoto and Holman, 2008). PIP2, Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. PIP3, Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate.

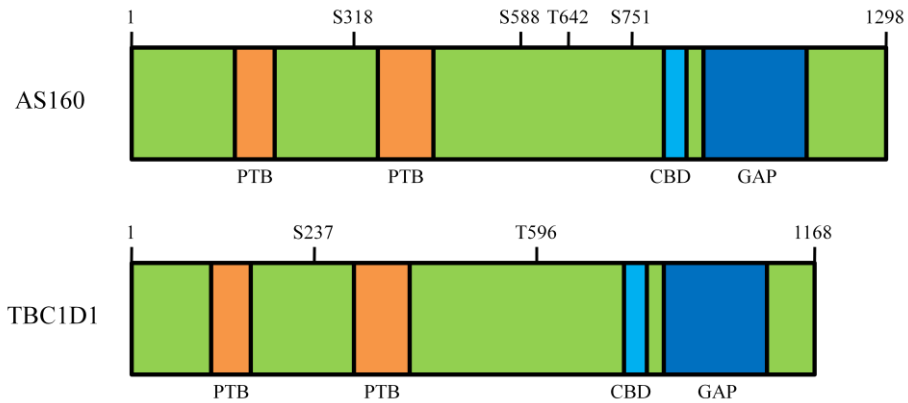


Figure 1.5 Schematic domain structures of human AS160 and TBC1D1. Akt stimulates phosphorylation of AS160 (Akt substrates of 160kDa) at 5 sites, and mutation of AS160 in which 4 of phosphorylation sites (Ser-318, Ser-588, Thr-642, Ser-751) had been mutated to alanine (AS160-4P) abolished insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes (Sano et al., 2003). Akt phosphorylates Thr596, and AMPK (AMP-activated protein kinase) phosphorylates Ser-237 of TBC1D1 (Sakamoto and Holman, 2008). PTB, Phosphotyrosine-binding domain. CBD, Calmodulin-binding domain. GAP, Rab GTPase-activating protein domain.

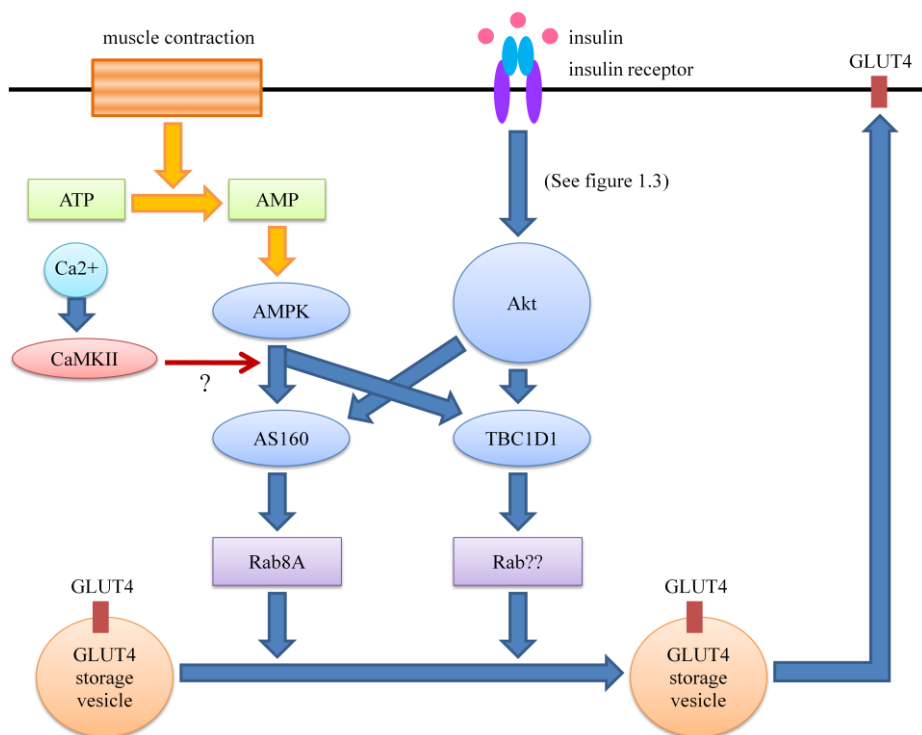


Figure 1.6 Signaling pathways for GLUT4 translocation in muscle cells. Contraction through energy depletion leads to activation of AMPK (AMP-activated protein kinase). The activated AMPK and Akt phosphorylates AS160 (Akt substrates of 160kDa) and TBC1D1 at multiple phosphorylation sites. This is thought to regulate translocation of GLUT4 via particular Rab proteins. Elevated intracellular Ca^{2+} may be involved in this signaling pathway by activating CaMKII (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II), but their exact role is not clearly known (Sakamoto and Holman, 2008; Richter and Hargreaves, 2013).

제 2 장. 연구 방법

2.1 도메인의 기질 특이성 분석

이번 연구에서는 서론의 연구 목적 부분에서 언급된 단백질 도킹 프로그램을 이용하여 인간의 Rab 단백질에 대한 AS160 및 TBC1D1의 Rab GAP 도메인의 기질 특이성을 분석하였다(Figure 2.1). 우선, PDB (Protein Data Bank)에서 AS160과 TBC1D1의 Rab GAP 도메인, 그리고 Rab 단백질의 구조 정보를 PDB 파일 형태로 수집하였고, 본격적인 단백질 도킹에 앞서 단백질 구조 상의 오류를 수정하고 최적화하기 위하여 FoldX (foldx.crg.es)의 RepairPDB 명령어를 사용하였다. 다음 단계로, 단백질 도킹 프로그램인 Hex (hex.loria.fr)와 ClusPro (cluspro.bu.edu)에 수정된 PDB 파일을 입력하여 Rab GAP 도메인과 Rab 단백질 간의 도킹을 수행하였고, FoldX의 Stability 명령어를 이용하여 각 프로그램에서 최적의 도킹 모형으로 선정된 단백질 복합체의 상호 작용 에너지를 계산하였다. 마지막으로, 임의의 절사점으로 각 상호 작용 에너지를 선택하였을 때에, 전체 Rab 단백질 중 각 절사점에서 AS160 및 TBC1D1의 Rab GAP 도메인과 상호 작용하는 Rab 단백질의 비율을 차례대로 계산하였다.

만약에, 연구 목적에 언급한 대로 AS160과 TBC1D1의 기능을 억제하였을 때에 포도당 수송량이 감소하는 비율이 전체 Rab 단백질들 중에서 Rab GAP 도메인과 상호 작용하는 비율과 유사하다고

가정을 한다면, 특정 절사점을 기준으로 하였을 때 Rab GAP 도메인과 상호 작용하는 Rab 단백질들에는 어떠한 것이 있는지 확인할 수 있다. 만약 이 결과가 기존 실험 연구 결과와 일치한다면 앞에서 세운 가정이 참임을 입증할 수 있으며, 이로부터 TBC1D1은 AS160과는 서로 다른 Rab 단백질들과 상호 작용을 함으로써 근육 세포 내의 포도당 수송 과정에서 AS160과 더불어 일정 역할을 담당한다고 결론을 내릴 수 있다.

2.2 데이터 세트의 구성

이번 연구에서는 생명정보학 데이터베이스인 PDB를 활용하였다. PDB는 1971년에 BNL (Brookhaven National Laboratories)에 의하여 구축된, 단백질을 비롯한 생물학적 거대 분자의 구조에 관련된 자료가 정리되어 있는 인터넷 상의 데이터베이스이다(Berman et al., 2000). 이 곳에는 X선 결정 분석법(X-ray crystallography) 이나 핵자기 공명 분광법(Nuclear Magnetic Resonance, NMR)에 의하여 밝혀진 거대 분자의 구조적 정보가 저장되어 있으며, 이 정보를 PDB 파일의 형태로 다운로드 받을 수 있다.

단백질 도킹을 수행하기 위해, 첫 번째로 X선 결정 분석법에 의해 밝혀진 인간의 AS160 및 TBC1D1의 Rab GAP 도메인의 구조를 PDB 파일로 다운로드 받았다(Park et al., 2011). 두 번째로, 기존 실험 연구에 의하여 GSV 내에 존재하는 것으로 알려진 Rab 단백질들의 구조를 PDB 파일로 다운로드 받았다. 기존 연구에서 GSV 내에서 발견된 Rab 단백질로는 Rab1A, Rab2A, Rab3A, Rab4A, Rab4B, Rab5A, Rab6, Rab7, Rab8A, Rab10, Rab11A, Rab11B, Rab14, Rab18, Rab21, Rab27A, Rab27B, Rab35가 있으며(Miinea et al., 2005), 이 중 인간에서의 구조가 밝혀져 PDB에 공개되어 있는 Rab 단백질에는 Rab1A, Rab2A, Rab4A, Rab4B, Rab5A, Rab6, Rab7, Rab8A, Rab11A, Rab11B, Rab14, Rab18, Rab21가 있다. 이번 연구에서는 이 Rab 단백질들의 구조를 PDB 파일로 다운로드 받아 분석 과정에 이용하였다(Zhu et al., 2004; Eathiraj et al., 2005; Huber and Scheidig, 2005; Scapin et al., 2006; McCray et al., 2010; Guo et al., 2013). 이 과정에서 동일한 Rab 단백질의 구조가 여러 개 존재할 경우에는 돌연변이가 없는 것을 선택하였으며, 만약 PDB 파일이 해당 Rab 단백질을 포함하여 여러 개의 사슬(chain)로 구성되어 있는 경우에는 그

중에서 Rab 단백질에 해당되는 파일만을 다운로드 받아서 사용하였다. AS160 및 TBC1D1의 Rab GAP 도메인과 각 Rab 단백질들의 3차원 구조는 PyMOL (www.pymol.org)을 사용하여 확인하였다(Figure 2.2, Figure 2.3).

2.3 FoldX를 이용한 최적화

현재 개발되어 있는 단백질 도킹 프로그램 중에서, 단순히 PDB 파일을 입력하는 것만으로 100% 신뢰할 만한 도킹 결과를 제시할 수 있는 프로그램은 존재하지 않는다. 그 이유는 크게 두 가지로 구분된다. 첫 번째 이유는, 아무리 복잡하고 정교한 힘장(force field)도 완전히 신뢰할 수 없기 때문이다. 두 번째 이유는, 단백질의 구조를 X선 결정 분석법으로 확인하는 과정이 매우 낮은 온도나 pH 등 생리적이지 않은 환경에서 진행되는 경우가 흔하고, 이러한 과정을 통해 얻어진 단백질 구조에는 원자 간의 거리나 각도가 표준적이지 않은 경우가 존재하기 때문이다. 따라서 이번 연구에서는 다운로드 받은 파일을 도킹에 사용하기에 앞서, FoldX를 이용하여 수정하는 과정을 시행하였다. FoldX는 단백질 또는 단백질 복합체의 안정성에 돌연변이가 미치는 영향을 빠르고 정확하게 평가하기 위하여 개발된 경험적 힘장(Empirical force field, EFF)으로, 이에 의한 단백질의 자유 에너지(kcal/mol)는 다음의 식으로 표현될 수 있다(Schymkowitz et al., 2005).

$$\begin{aligned} \Delta G = & a \cdot \Delta G_{\text{vdw}} + b \cdot \Delta G_{\text{solvH}} + c \cdot \Delta G_{\text{solvP}} + d \cdot \Delta G_{\text{wb}} + e \cdot \Delta G_{\text{hbond}} \\ & + f \cdot \Delta G_{\text{el}} + g \cdot T\Delta S_{\text{mc}} + h \cdot T\Delta S_{\text{sc}} + i \cdot \Delta G_{\text{clash}} \end{aligned}$$

위 공식에서 (a ... i) 는 자유 에너지 계산에 사용되는 서로 다른 에너지 항들에 대한 상대적인 가중치이다. ΔG_{vdw} 는 모든 원자들의 반데르발스 힘의 총합이다. ΔG_{solvH} 와 ΔG_{solvP} 는, 극성기(polar group) 및 무극성기(apolar group)가 접하지 않은 상태(unfolded state)에서 접한 상태(folded state)로 변화할 때의 용매화 에너지(solvation energy)의 차이이다. ΔG_{wb} 는 물 분자가 단백질과 하나 이상의 수소 결합을 이루면서 안정화되는 데에 추가로 필요한 자유

에너지다. ΔG_{hbond} 는 단백질과 용매 사이의 수소 결합 형성과 비교하였을 때, 단백질 내 수소 결합 형성과의 자유 에너지 차이를 뜻한다. ΔG_{el} 은 나선 쌍극자(helix dipole)를 포함하여 전하를 띤 기(charged group)의 정전기적 기여도를 나타낸다. ΔS_{mc} 는 접힌 상태에서 뼈대(backbone)를 고정시키는 데에 필요한 엔트로피 비용이며, ΔS_{sc} 는 곁가지(side chain)를 특정 형태로 고정시키는 데에 필요한 엔트로피 비용이다. 마지막으로, ΔG_{clash} 는 단백질 구조를 구성하고 있는 원자들 간의 입체적인 위치상의 중복을 계산하는 항목이다.

FoldX는 앞서 언급한 PDB 파일의 오류를 수정할 수 있는 RepairPDB라는 명령어를 제공하고 있다. 이를 이용하여 PDB에서 다운로드 받은 AS160 및 TBC1D1의 Rab GAP 도메인, 그리고 GSV 내에 존재하는 Rab 단백질들의 구조를 모두 수정하고 최적화하여 새로운 PDB 파일을 얻었고, 이를 추후 단백질 도킹 프로그램에 입력할 데이터로 사용하였다(Figure 2.4).

2.4 Hex와 ClusPro를 이용한 단백질 도킹

컴퓨터를 이용하여 단백질 도킹을 예측하는 과정에서는 일반적으로 단백질 간의 결합 부위에 대한 정보가 부족하기 때문에, 6개의 자유도 (3방향 축의 병진 운동과 3방향의 회전 운동) 하에 결합 가능한 단백질 간의 도킹을 탐색하는 과정이 필요하게 되었다. 단백질의 뼈대와 결합지에 주어진 이러한 높은 자유도 하에서 이루어지는 단백질 도킹은 그 과정에서 엄청난 컴퓨터 자원을 요구할 수 밖에 없었으며, 이러한 이유로 단백질 도킹 프로그램에 있어서 검색 전략의 효율성이 가장 중요한 요소로 자리잡게 되었다. 이러한 전략 하에, 지난 수 년간 다양한 알고리즘과 스코어링 함수(scoring function)를 기반으로 한 단백질 도킹 프로그램이 개발되었다(Huang, 2014). 단백질 도킹 프로그램들은 검색 전략에 따라서 여러 가지 범주로 구분되며, 그 중에서도 FFT (Fast Fourier transform) 또는 SFT (Spherical Fourier transform) 기반의 도킹 알고리즘을 사용한 도킹 프로그램이 현재 가장 많이 사용되고 있다. 이들은 도킹하는 단백질의 구조가 고정되어 있다는 가정 하에 자유도 6의 검색 공간 내에서 가능한 모든 도킹 모형을 검색하고, 이들 단백질 복합체 각각의 자유 에너지를 계산한 후 가장 자유 에너지가 낮은 도킹 모형을 최적의 모형으로 선택하는 과정을 거친다. 이번 연구에서는 단백질 도킹을 수행하는 생명정보학적 도구로 Hex와 ClusPro를 사용하여, FoldX를 통해 최적화된 PDB 파일을 입력하여 최적의 도킹 모형을 탐색하였다.

Hex는 두 단백질의 3차원 구조에 대한 정보만으로 단백질 간의 상호 작용을 계산하고 분석하는 단백질 도킹 프로그램 중의 하나이다(Ritchie et al., 2008; Macindoe et al., 2010). Hex 이전에 개발되었던 단백질 도킹 프로그램들은 3차원 데카르트 좌표계(3D Cartesian grid) 기반의 FFT 도킹 알고리즘을 사용함으로써 축

3방향의 자유도에 대한 검색 과정만이 가속화되어 결과를 도출하는 과정에 시간이 많이 소요된다는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위해서 Hex는 회전 상관함수(rotational correlation)를 사용한 SPF (Spherical polar Fourier) 상관함수를 도입함으로써, 축 3방향뿐만 아니라 회전 3방향에 대한 검색 과정 역시 가속화시킬 수 있고, 결과적으로 기존 프로그램과 비교하였을 때 단백질 도킹과 관련된 계산 과정을 더 빠르게 진행할 수 있도록 개발되었다. 또한 Hex는 도킹 결과를 그림으로 나타내는 기능을 갖추고 있다. 이번 연구에서는 Hex 8.0.0 버전을 사용하였으며, 각 단백질 간의 최적의 도킹 모형을 탐색하기 위하여 사용된 매개 변수 설정은 다음과 같다.

- Correlation type: Shape + Electro + DARS
- FFT Mode: 3D fast lite
- Grid Dimension: 0.6
- Receptor Range: 180
- Ligand Range: 180
- Twist Range: 360
- Distance Range: 40

처음 단백질 도킹 프로그램이 고안될 당시의 스코어링 함수는, 상호 작용을 하는 두 단백질의 형태의 상보성(shape complementarity) 만 기초를 두고 있었다(Katchalski-Katzir et al., 1992). 그러나 보다 더 자연 상태에 가까운 단백질 도킹의 필요성이 강조됨에 따라, 정전기적 상호 작용(electrostatic interaction)에 대한 항목이 스코어링 함수에 포함된 도킹 프로그램들이 개발되기 시작하였으며(Gabb et al., 1997; Mandell et al., 2001), Hex는 이를 고려하여 만들어진 단백질 도킹 프로그램들 중의 하나이다(Ritchie

and Kemp, 2000). 또한, 이 두 요소만으로는 일부 단백질 도킹 과정에서의 정확도가 현저히 떨어지는 문제가 발견되었으며, 이에 따라 새롭게 도입된 방법이 DARS (Decoys As the Reference State)이다(Chuang et al., 2008). 이것은, 원자의 종류는 고려하지 않은 상태에서 좋은 구조적 상보성을 가지는 도킹된 단백질 구조들의 집합을 만들고, 이 집합 중에서 특정 상호 작용이 일어나는 빈도수를 기준 상태(reference state)로 사용하는 방법이다. 이 결과값은 단백질 간의 실제 상호 작용에 가까운 도킹 구조를 탐색하는 데에 효과적이며, 기존의 다른 항목들과 함께 스코어링 함수에 포함될 수 있다. Hex 8.0.0 버전에는 DARS를 스코어링 함수에 포함시킬 수 있는 옵션을 제공하고 있어서, 보다 더 정확한 단백질 도킹을 위하여 상관함수의 유형(correlation type)으로 ‘Shape + Electro + DARS’를 선택하여 분석을 진행하였다(Figure 2.5).

ClusPro는 컴퓨터 프로그램을 통해 결정된 단백질 도킹 모형들이 자연 상태에서의 도킹 모형에 클러스터링(clustering)하는 특성을 이용하여, 에너지 함수만을 기준으로 단백질 도킹 모형의 순위를 결정하여 최적의 모형을 탐색하였던 기존 단백질 도킹 프로그램의 단점을 보완한 프로그램이다(Kozakov et al., 2005)(Figure 2.6). ClusPro의 알고리즘은 크게 세 단계로 진행된다. 첫 번째로, FFT 상관함수를 이용한 단백질 도킹 프로그램인 PIPER를 실행하여, 단백질을 구성하는 각 원자들 간의 상호 작용에 의한 에너지를 계산하고, 이 에너지가 가장 낮은 1000개의 모형을 선택한다. 이때 단백질 복합체의 자유 에너지 함수는 다음의 식으로 표현된다.

$$E = \omega_1 E_{\text{rep}} + \omega_2 E_{\text{att}} + \omega_3 E_{\text{elec}} + \omega_4 E_{\text{DARS}}$$

위 공식에서 ($\omega_1 \dots \omega_4$)는 에너지 함수를 구성하는 서로 다른 에너지 항들에 대한 상대적인 가중치이다. E_{rep} 와 E_{att} 는

단백질 도킹의 3차원 구조에 따라 발생하는 원자 간의 척력과 인력을 뜻한다. E_{elec} 는 정전기적 기여도를 나타내는 항이며, E_{DARS} 는 앞서 Hex의 알고리즘 설명 과정에서 언급하였던 DARS 퍼텐셜을 뜻한다(Kozakov et al., 2006).

두 번째로, 도킹하는 단백질 중 수용체(receptor)에 해당하는 단백질의 특정 원자를 기준으로 10\AA 이내에 위치하는 리간드(ligand) 원자들의 RMSDs (Root-mean-squared deviations)에 따라서 클러스터링을 시행하고, 클러스터의 크기가 큰 순서대로 상위 30개를 선택함으로써 최적의 에너지를 가진 단백질 도킹 모형을 탐색한다(Kozakov et al., 2005). 세 번째로, Monte Carlo simulation을 이용하여 이 클러스터들의 안정성을 분석하고, 최적화 과정을 통해서 마지막으로 단백질 도킹 모형을 수정한다. 이러한 분석 결과는 첫 단계의 분석 과정에서 사용한 에너지 함수를 구성하는 각 항목의 가중치에 따라서 (1) Balanced, (2) Electrostatic-favored, (3) Hydrophobic-favored, (4) VdW+Elec 네 가지로 제시된다. 이번 연구에서는 Balanced의 결과 중에서 클러스터의 크기가 가장 큰 도킹 모형을 선택하였으며, 이 때에 가중치를 적용한 단백질 복합체의 자유 에너지 함수는 다음과 같다.

$$E = 0.40E_{rep} + -0.40E_{att} + 600E_{elec} + 1.00E_{DARS}$$

2.5 FoldX를 이용한 결합 자유 에너지의 계산

앞 단계에서 Hex와 ClusPro로 각각 구한 최적의 도킹 모형을 PDB 파일로 저장한 후에, 이를 FoldX로 분석하여 AS160 및 TBC1D1의 Rab GAP 도메인과 각 Rab 단백질 간의 상호 작용 에너지를 계산하고, 이를 바탕으로 각 단백질 간의 상대적인 결합 친화도를 비교 및 평가하였다. 우선 FoldX의 Stability 명령어를 사용하여, 앞서 2.3에서 RepairPDB 명령어를 통하여 최적화 과정을 거친 AS160 및 TBC1D1의 Rab GAP 도메인, 그리고 각 Rab 단백질들의 자유 에너지를 계산하였다. 그 다음으로, Hex와 ClusPro 프로그램에서 각각 최적의 도킹 모형으로 도출된 단백질 복합체의 자유 에너지를, 위와 동일한 방식으로 FoldX의 Stability 명령어를 사용하여 계산하였다. 이 계산 결과를 바탕으로, 다음의 공식을 이용하여 상호 작용 에너지 값을 도출하였다.

$$\Delta G_{\text{binding}} = \Delta G_{\text{AB}} - (\Delta G_{\text{A}} + \Delta G_{\text{B}})$$

($\Delta G_{\text{binding}}$: 상호 작용 에너지, ΔG_{AB} : 단백질 복합체의 자유 에너지,

$\Delta G_{\text{A}}, \Delta G_{\text{B}}$: 각 단백질의 자유 에너지)

2.6 상호 작용 에너지 절사점의 선정

앞 단계에서 도출한 상호 작용 에너지를 바탕으로 해서, AS160 또는 TBC1D1의 Rab GAP 도메인에 대한 각 Rab 단백질의 결합 친화도의 우선 순위를 결정하였다. 각 단백질 도킹 프로그램마다 제시하는 알고리즘에 차이가 있고, 또한 이는 생체 내에서의 상태를 완벽히 반영하지는 못하기 때문에, 특정 Rab 단백질과의 상호 작용 유무를 절대적인 절사점을 기준으로 판별하는 것은 다소 무리가 있다. 따라서 본 연구에는, 우선 각 단백질 도킹 프로그램(Hex, ClusPro)을 통해 얻어진 상호 작용 에너지의 값들을 크기를 기준으로 차례대로 나열한 후, 임의의 절사점을 작은 값에서부터 시작하여 큰 값으로 올려 가면서 설정하였다. 이 때에, 각 Rab 단백질이 임의로 설정한 절사점에서 AS160 또는 TBC1D1의 Rab GAP 도메인과 상호 작용하는지의 여부를 조사하고, 전체 Rab 단백질 중 각 절사점에서 Rab GAP 도메인과 상호 작용하는 Rab 단백질의 비율을 차례대로 계산하였다. 마지막으로 이 결과를 기존 실험 연구에서 도출된 결과와 비교하고, 고찰 부분에서는 본 연구를 통해서 새로 밝혀진 사실 및 한계점에 대해 논의하고자 한다.

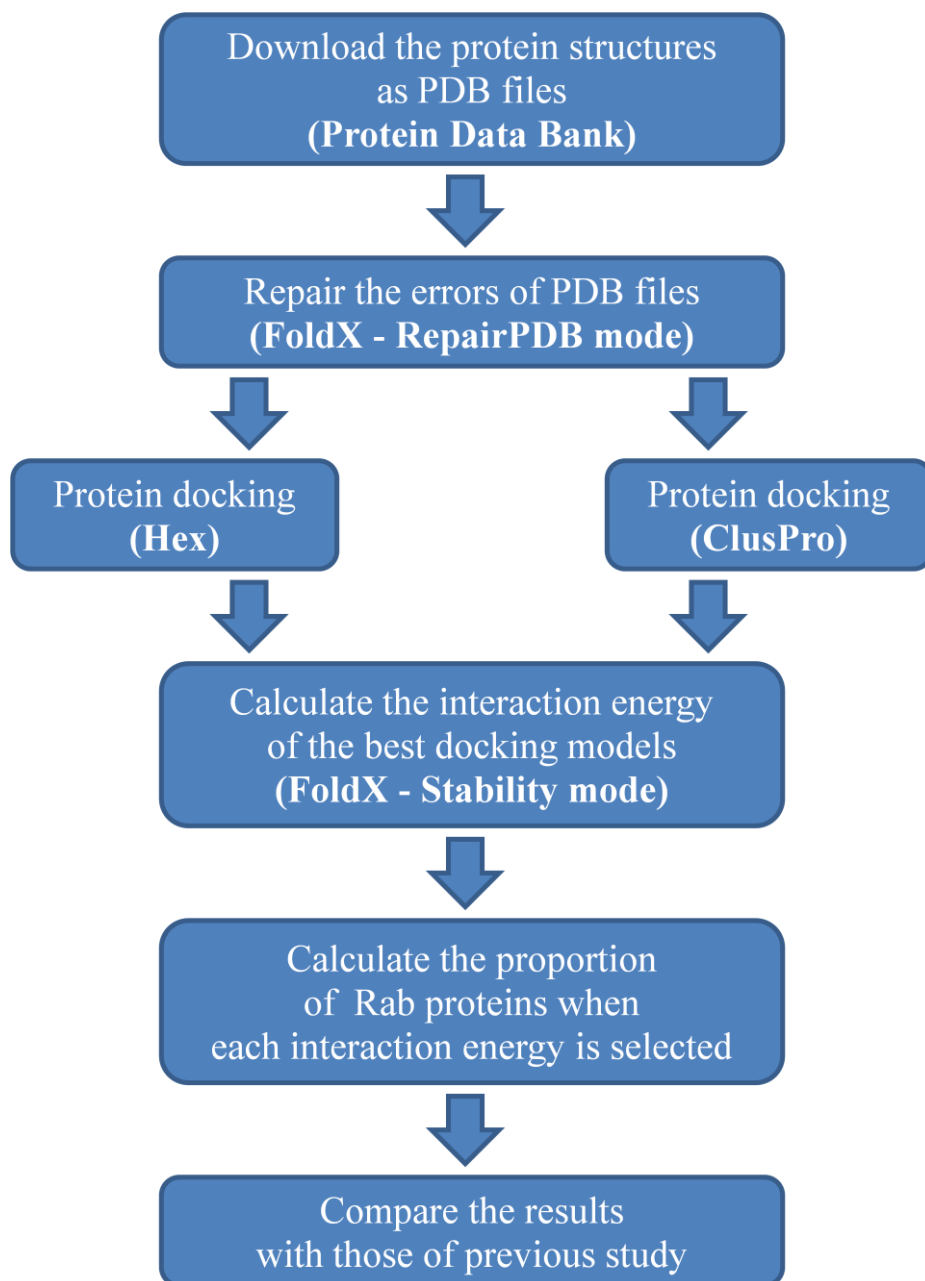
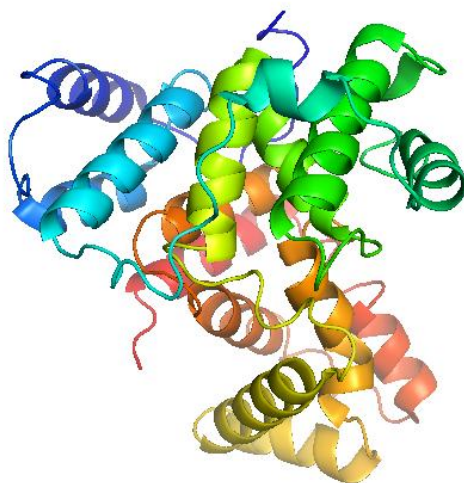


Figure 2.1 The flowchart of the protocol of protein docking using in this study. See text 2.1 for details.

(a)



(b)

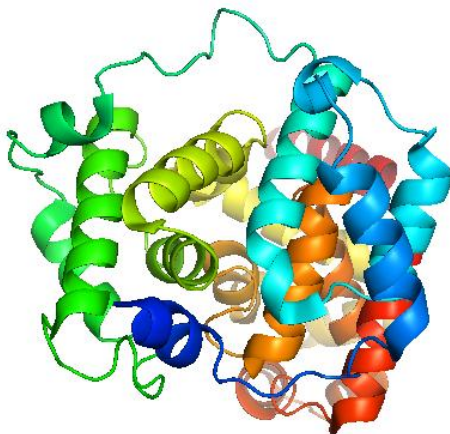


Figure 2.2 Structures of Rab GAP domains of (a) AS160 and (b) TBC1D1.
(Park, Jin et al 2011, viewing in PyMOL)

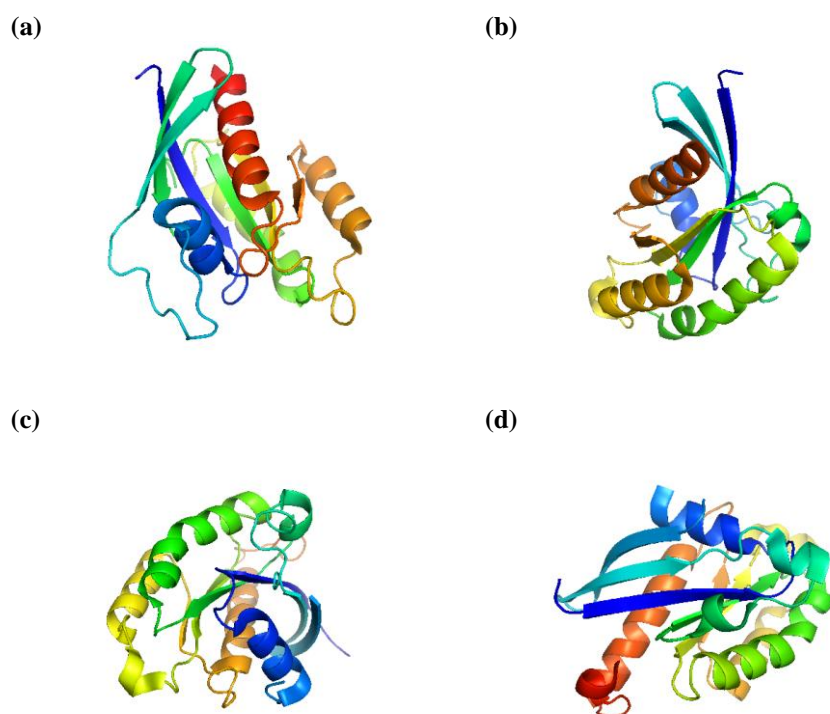
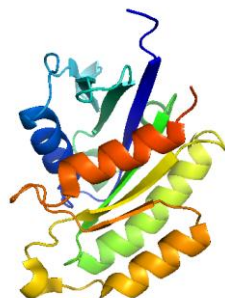


Figure 2.3.1 Structures of Rab proteins. (a) Rab1A, (b) Rab2A, (c) Rab4A, and (d) Rab4B (Eathiraj et al., 2005; Huber and Scheidig, 2005, viewing in PyMOL).

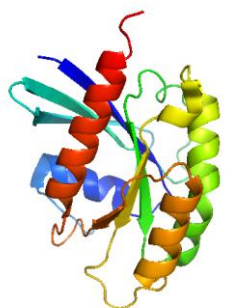
(a)



(b)



(c)



(d)

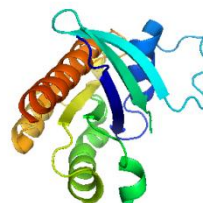
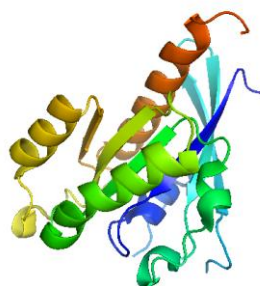


Figure 2.3.2 Structures of Rab proteins. (a) Rab5A, (b) Rab6, (c) Rab7 and (d) Rab8A (Zhu et al., 2004; Eathiraj et al., 2005; McCray et al., 2010; Guo et al., 2013, viewing in PyMOL).

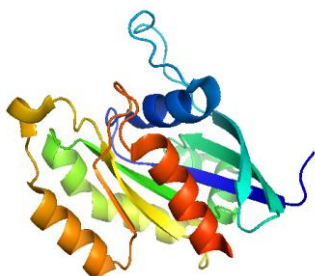
(a)



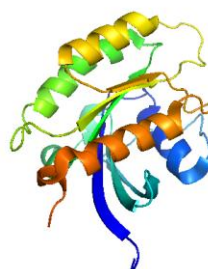
(b)



(c)



(d)



(e)

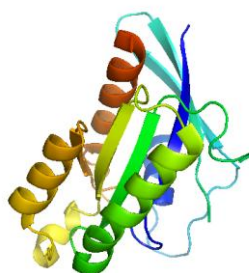


Figure 2.3.3 Structures of Rab proteins. (a) Rab11A, (b) Rab11B, (c) Rab14, (d) Rab18, and (e) Rab21 (Eathiraj et al., 2005; Scapin et al., 2006, viewing in PyMOL).

```

MainChain Atoms 05* missing for <Rab4B>2052-new.pdb GDPA601. Creating a GAP.
<Rab4B>2052-new.pdb
1 models read.
number of incomplete residues = 6
completing sidechain atoms of GLUA30
completing sidechain atoms of ARG69
completing sidechain atoms of ARG138
completing sidechain atoms of LYS164
completing sidechain atoms of GLUA181
completing sidechain atoms of ARG182
<Rab4B>2052-new.pdb

BackHbond      =          -122.47
SideHbond      =          -35.71
Energy_UdW     =          -194.88
Electro        =           -7.99
Energy_SolvP   =           266.23
Energy_SolvH   =          -258.74
Energy_vdwclash =           18.63
energy_torsion  =            3.56
backbone_vdwclash =         109.01
Entropy_sidec  =           97.45
Entropy_mainc  =          255.89
water bonds    =           -3.03
helix dipole   =            0.40
loop_entropy   =            0.00
cis_bond       =            0.00
disulfide      =            0.00
kn electrostatic =           0.00
partial covalent interactions = -2.67
Energy_Ionisation =           0.05
Entropy Complex =            0.00

-----
Total          =                      16.72

FINISHING STABILITY ANALYSIS OPTION

Command Stability runtime = 14.62 seconds.

Pdb <Rab4B>2052-new.pdb runtime = 14.84 seconds.

```

Figure 2.4 Repairing the PDB file (Rab4B) by using RepairPDB command of FoldX program. The X-ray structures downloaded from Protein Data Bank may have errors such as non-standard angles or distances, and biased conformations. So it is necessary to run RepairPDB command of FoldX prior to any energy calculation.

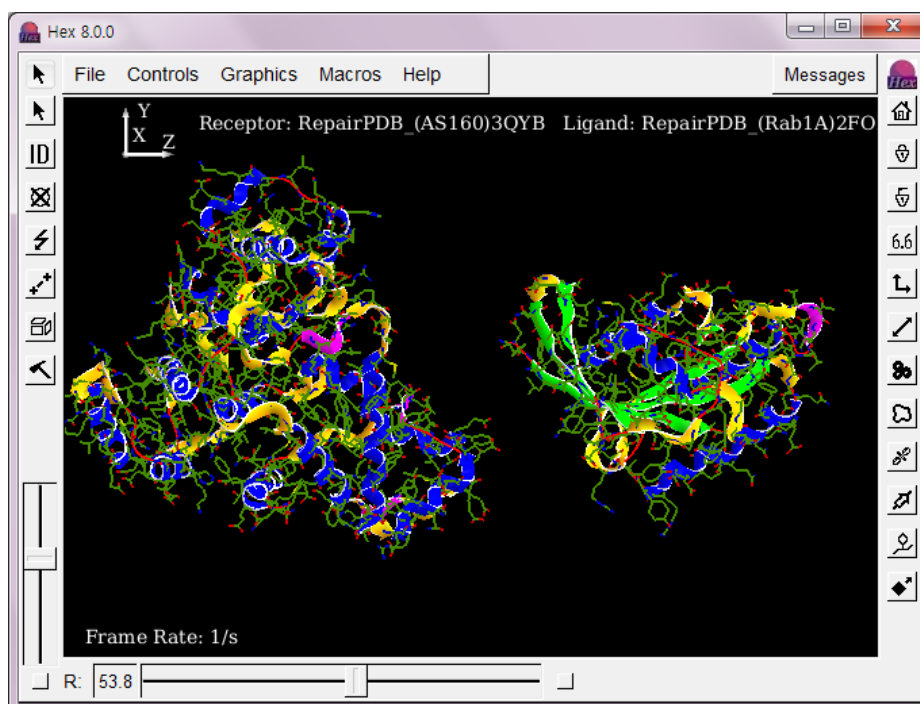

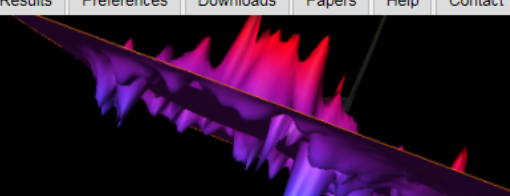


Figure 2.5 The docking process of Rab GAP domain of AS160 and Rab1A protein using Hex 8.0.0 program. See text 2.4 for details.

[Dock](#)
[Queue](#)
[Results](#)
[Preferences](#)
[Downloads](#)
[Papers](#)
[Help](#)
[Contact](#)

[sign out](#)

Dock

Job Name:

Server:

Accepted PDB Input:
 20 standard amino acids and RNA (as receptor only), ref: [RNA](#) Select Heparin Mode to use Heparin as Ligand.

Receptor

[Use PDB ID](#)

Chains:

Ligand

[Use PDB ID](#)

Chains:

Whitespace separate desired chains. Leave chains blank to use all chains.

▶ **Advanced Options**

ClusPro should only be used for noncommercial purposes.
 Structural Bioinformatics Lab
 Boston University

Figure 2.6 The docking process of Rab GAP domain of AS160 and Rab1A protein using ClusPro. This first web page is used to specify the PDB files to be uploaded. See text 2.4 for details.

제 3 장. 연구 결과

3.1 Hex와 ClusPro를 이용한 단백질 도킹 결과

Hex를 이용하여 AS160 또는 TBC1D1의 Rab GAP 도메인과, GSV 내에 존재하는 것으로 밝혀진 Rab 단백질들의 도킹을 시행한 결과는 Table 3.1에 제시되어 있다. 각 Rab 단백질들의 최적의 도킹 모형의 에너지 값을 기준으로 보았을 때, AS160의 Rab GAP 도메인과 결합 친화도가 높을 것으로 예상되는 Rab 단백질들은 Rab4B (-945.02KJ/mol), Rab5A (-933.50KJ/mol), Rab8A (-917.56KJ/mol), Rab14 (-973.06KJ/mol), Rab21 (-1033.58KJ/mol) 등이 있으며, TBC1D1의 Rab GAP 도메인과 결합 친화도가 높을 것으로 예상되는 Rab 단백질들은 Rab5A (-969.06KJ/mol), Rab7 (-891.90KJ/mol), Rab11B (-871.78KJ/mol), Rab14 (-990.67KJ/mol), Rab21 (-914.80KJ/mol) 등이 있다. 다만 이 결과는 FoldX를 이용한 최종 계산 과정을 거치지 않은 상태로, 해석에는 다소 제한이 있음을 참고할 필요가 있다.

ClusPro를 이용하여 AS160 또는 TBC1D1의 Rab GAP 도메인과, GSV 내에 존재하는 것으로 밝혀진 Rab 단백질들의 도킹을 시행한 결과는 Table 3.2에 제시되어 있다. 각 Rab 단백질들의 최적의 도킹 모형의 클러스터 크기를 기준으로 보았을 때, AS160의 Rab GAP 도메인과 결합 친화도가 높을 것으로 예상되는 Rab 단백질들은 Rab4A (138), Rab5A (145), Rab6 (161), Rab18 (171) 등이 있으며, TBC1D1의 Rab GAP 도메인과 결합 친화도가 높을 것으로 예상되는 Rab 단백질들은 Rab1A (138), Rab6 (129),

Rab8A (163), Rab18 (262) 등이 있다. 다만 이 결과 역시 FoldX를 이용한 최종 계산 과정을 거치지 않은 상태로, 해석에는 다소 제한이 있음을 참고할 필요가 있다.

3.2 FoldX를 이용한 상호 작용 에너지 계산결과

Hex 및 ClusPro에서 최적의 도킹 모형으로 도출된 Rab GAP 도메인과 Rab 단백질의 복합체를, FoldX를 이용하여 분석하여 상호 작용 에너지를 계산한 결과는 Table 3.3과 Table 3.4에 제시되어 있다. 우선, AS160의 Rab GAP 도메인의 자유 에너지는 130.41kcal/mol, TBC1D1의 Rab GAP 도메인의 자유 에너지는 -80.70kcal/mol로 확인되었다. 그리고 각 Rab 단백질들의 자유 에너지와, Rab GAP 도메인 - Rab 단백질 복합체들의 자유 에너지는 Table 3.3과 Table 3.4에 제시되어 있다. 이 결과를 바탕으로 AS160 및 TBC1D1의 Rab GAP 도메인과 Rab 단백질들 간의 상호 작용 에너지를 계산하였다.

Hex를 사용하였을 때, AS160의 Rab GAP 도메인과 결합 친화도가 높을 것으로 예상되는 Rab 단백질들은 Rab1A (71.05kcal/mol), Rab2A (71.48kcal/mol), Rab11B (76.88kcal/mol) 등이 있으며, TBC1D1의 Rab GAP 도메인과 결합 친화도가 높을 것으로 예상되는 Rab 단백질들은 Rab1A (74.43kcal/mol), Rab4A (71.85kcal/mol), Rab4B (82.39kcal/mol) 등이 있다 (Table 3.3, Figure 3.1). ClusPro를 사용하였을 때, AS160의 Rab GAP 도메인과 결합 친화도가 높을 것으로 예상되는 Rab 단백질들은 Rab1A (223.49kcal/mol), Rab7 (219.03kcal/mol), Rab21 (207.53kcal/mol) 등이 있으며, TBC1D1의 Rab GAP 도메인과 결합 친화도가 높을 것으로 예상되는 Rab 단백질들은 Rab1A (243.13kcal/mol), Rab7 (225.27kcal/mol), Rab14

(254.41kcal/mol) 등이 있다 (Table 3.4, Figure 3.2).

3.3 임의의 절사점 선택 시, Rab GAP 도메인과 Rab 단백질들의 상호 작용 비율

Table 3.3과 Table 3.4에서 도출된 상호 작용 에너지 값들을 크기 순서대로 나열하여 각각을 임의의 절사점으로 선택하고, 해당 절사점에서 전체 Rab 단백질들 중 AS160 또는 TBC1D1의 Rab GAP 도메인과 상호 작용하는 Rab 단백질들의 비율을 백분율로 나타낸 결과는 Table 3.5와 같다. 예를 들면, Hex 프로그램으로부터 도출된 결과 분석 시에 상호 작용 에너지의 절사점을 91.41kcal/mol로 임의로 선택하였을 경우, 전체 Rab 단백질들 중 AS160의 Rab GAP 도메인과 상호 작용하는 Rab 단백질들의 비율은 23.08%이고, TBC1D1의 Rab GAP 도메인과 상호 작용하는 Rab 단백질들의 비율은 46.15%이다. 또한, ClusPro 프로그램으로부터 도출된 결과 분석 시에 상호 작용 에너지의 절사점을 265.90kcal/mol로 임의로 선택하였을 경우, 전체 Rab 단백질들 중 AS160의 Rab GAP 도메인과 상호 작용하는 Rab 단백질들의 비율은 46.15%이고, TBC1D1의 Rab GAP 도메인과 상호 작용하는 Rab 단백질들의 비율은 30.77%이다.

그러나 Table 3.5에 제시되어 있는 여러 개의 절사점 중에서 어떤 것이 Rab GAP 도메인과 각 Rab 단백질 간의 실제 상호 작용을 정확하게 반영하는지에 대해서는, 상호 작용 여부를 판단할 절대적인 기준점이 존재하지 않기 때문에 이 결과만으로 결론을 내릴 수는 없다. 따라서 고찰 부분에서는 이번 연구 결과를, AS160과 TBC1D1 유전자의 기능이 상실되었을 때에 포도당

수송량에 어느 정도의 변화가 있는지를 확인하였던 기존 실험 연구 결과와 비교 분석하고, 이를 바탕으로 2.1에서 제시하였던 가설이 합당한지 판단해 보고자 한다.

Table 3.1 Docking results of Rab GAP domain of AS160 and TBC1D1 with Rab proteins using Hex, according to E-total (KJ/mol)

| | Rab GAP domain of AS160 | Rab GAP domain of TBC1D1 |
|--------|-------------------------|--------------------------|
| Rab1A | -775.16 | -695.73 |
| Rab2A | -881.79 | -756.21 |
| Rab4A | -702.38 | -689.11 |
| Rab4B | -945.02 | -860.32 |
| Rab5A | -933.50 | -969.06 |
| Rab6 | -871.79 | -818.42 |
| Rab7 | -874.93 | -891.90 |
| Rab8A | -917.56 | -818.62 |
| Rab11A | -846.18 | -806.22 |
| Rab11B | -880.36 | -871.78 |
| Rab14 | -973.06 | -990.67 |
| Rab18 | -779.32 | -715.37 |
| Rab21 | -1033.58 | -914.80 |

Table 3.2 Docking results of Rab GAP domain of AS160 and TBC1D1 with Rab proteins using ClusPro, according to size of cluster

| | Rab GAP domain of AS160 | | | Rab GAP domain of TBC1D1 | | |
|--------|-------------------------|--------|---------------|--------------------------|--------|---------------|
| | Members | Center | Lowest energy | Members | Center | Lowest energy |
| Rab1A | 85 | -687.5 | -807.7 | 138 | -631.7 | -781.8 |
| Rab2A | 88 | -687.3 | -740.2 | 100 | -629.5 | -742.4 |
| Rab4A | 138 | -662.6 | -801.7 | 106 | -615.5 | -763.9 |
| Rab4B | 104 | -670.4 | -816.1 | 118 | -629.5 | -754.6 |
| Rab5A | 145 | -740.6 | -894.8 | 107 | -708.8 | -809.9 |
| Rab6 | 161 | -659.8 | -861.4 | 129 | -635.9 | -760.6 |
| Rab7 | 102 | -602.7 | -691.0 | 105 | -625.7 | -699.8 |
| Rab8A | 128 | -836.9 | -836.9 | 163 | -672.6 | -846.3 |
| Rab11A | 99 | -735.2 | -1137.9 | 94 | -643.4 | -799.5 |
| Rab11B | 83 | -673.6 | -860.3 | 103 | -675.4 | -848.0 |
| Rab14 | 115 | -796.0 | -846.2 | 112 | -739.4 | -869.8 |
| Rab18 | 171 | -716.2 | -817.6 | 262 | -634.1 | -727.2 |
| Rab21 | 89 | -627.0 | -740.7 | 79 | -653.4 | -744.1 |

Table 3.3 Calculated interaction energy of Rab GAP domain of AS160 and TBC1D1 with Rab proteins using Hex (kcal/mol)

| | Free energy of Rab protein | AS160 | | TBC1D1 | |
|--------|----------------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|
| | | Free energy of complex | Interaction energy | Free energy of complex | Interaction energy |
| Rab1A | 5.39 | 206.86 | 71.05 | -0.88 | 74.43 |
| Rab2A | -20.61 | 181.28 | 71.48 | -11.37 | 89.94 |
| Rab4A | -24.85 | 230.76 | 125.20 | -33.71 | 71.85 |
| Rab4B | -30.49 | 225.75 | 125.84 | -28.81 | 82.39 |
| Rab5A | -6.35 | 246.79 | 122.72 | 10.63 | 97.69 |
| Rab6 | -24.50 | 246.01 | 140.10 | -7.21 | 97.99 |
| Rab7 | 26.13 | 301.19 | 144.65 | 60.59 | 115.16 |
| Rab8A | -20.48 | 238.81 | 128.88 | -25.20 | 75.99 |
| Rab11A | -21.90 | 216.47 | 107.96 | -3.62 | 98.98 |
| Rab11B | -36.90 | 170.40 | 76.88 | -18.92 | 98.68 |
| Rab14 | -2.91 | 265.33 | 137.82 | 59.50 | 143.11 |
| Rab18 | -18.06 | 218.69 | 106.34 | -7.35 | 91.41 |
| Rab21 | 7.35 | 242.17 | 104.41 | 63.49 | 136.84 |

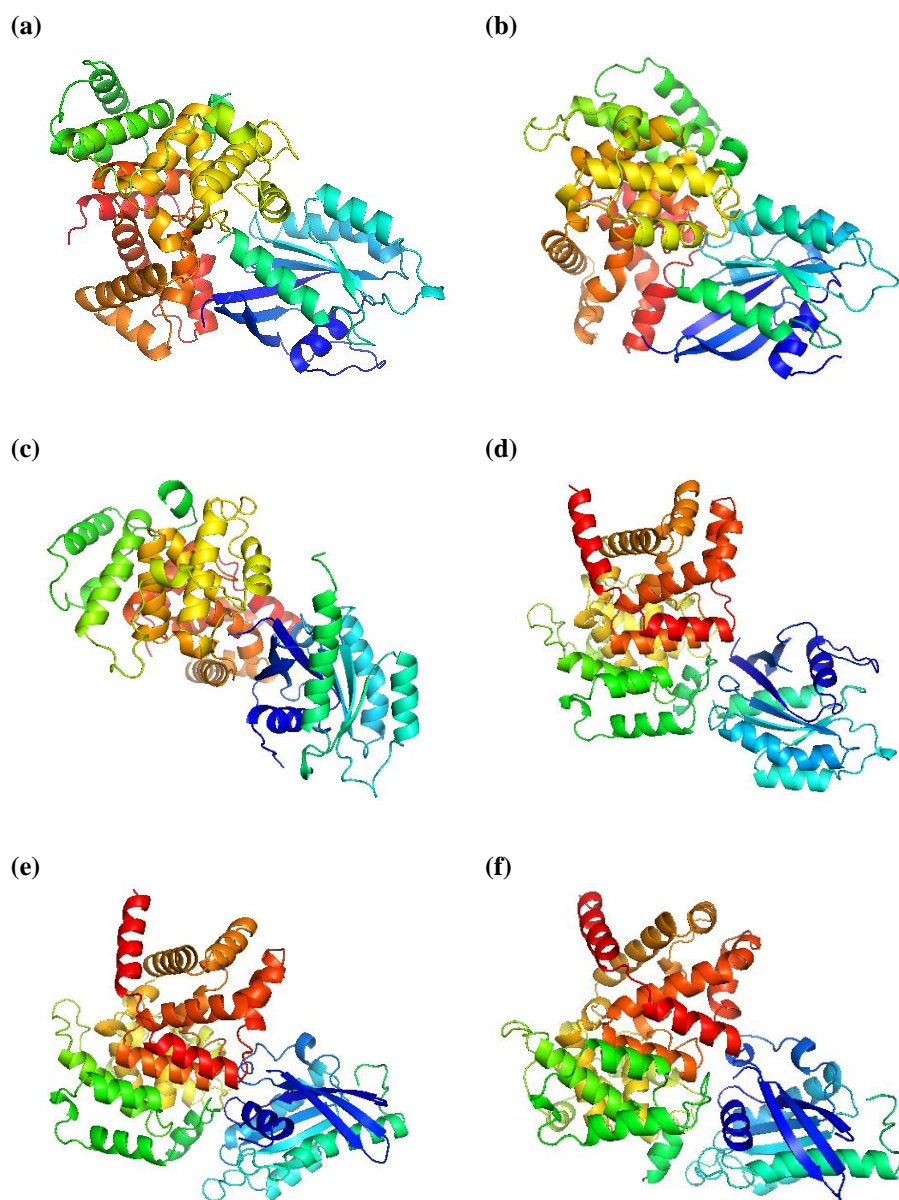


Figure 3.1 The docking results using Hex. Rab GAP domain of AS160 and (a) Rab1A, (b) Rab2A, (c) Rab11B. Rab GAP domain of TBC1D1 and (d) Rab1A, (e) Rab4A, (f) Rab4B. (viewing in PyMOL)

Table 3.4 Calculated interaction energy of Rab GAP domain of AS160 and TBC1D1 with Rab proteins using ClusPro (kcal/mol)

| | Free energy of Rab protein | AS160 | | TBC1D1 | |
|--------|----------------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|
| | | Free energy of complex | Interaction energy | Free energy of complex | Interaction energy |
| Rab1A | 5.39 | 359.30 | 223.49 | 167.83 | 243.13 |
| Rab2A | -20.61 | 379.12 | 269.32 | 195.56 | 296.87 |
| Rab4A | -24.85 | 375.42 | 269.86 | 188.98 | 294.53 |
| Rab4B | -30.49 | 393.42 | 293.50 | 204.37 | 315.56 |
| Rab5A | -6.35 | 360.26 | 236.20 | 183.44 | 270.49 |
| Rab6 | -24.50 | 393.75 | 287.84 | 195.40 | 300.60 |
| Rab7 | 26.13 | 375.57 | 219.03 | 170.70 | 225.27 |
| Rab8A | -20.48 | 379.87 | 269.94 | 192.15 | 293.33 |
| Rab11A | -21.90 | 390.45 | 281.94 | 190.14 | 292.75 |
| Rab11B | -36.90 | 380.60 | 287.08 | 182.40 | 300.00 |
| Rab14 | -2.91 | 372.33 | 244.83 | 170.80 | 254.41 |
| Rab18 | -18.06 | 378.26 | 265.90 | 193.58 | 292.34 |
| Rab21 | 7.35 | 345.29 | 207.53 | 187.83 | 261.18 |

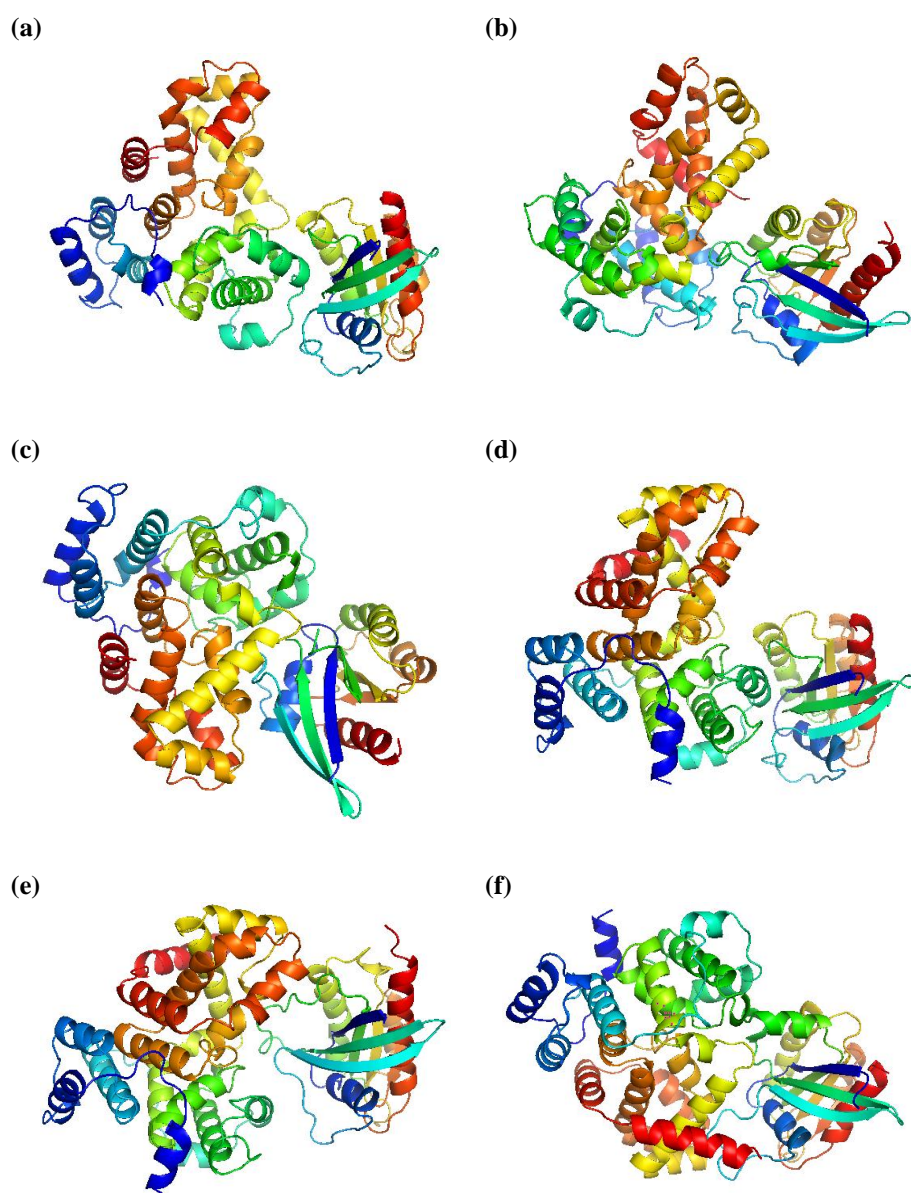


Figure 3.2 The docking results using ClusPro. Rab GAP domain of AS160 and (a) Rab1A, (b) Rab7, (c) Rab21. Rab GAP domain of TBC1D1 and (d) Rab1A, (e) Rab7, (f) Rab14. (viewing in PyMOL)

Table 3.5 Temporary cutoff values of interaction energy and the percentage of the Rab proteins that interact with Rab GAP domains of AS160 or TBC1D1

| Hex | | | ClusPro | | |
|-----------------------------|--------------|---------------|-----------------------------|--------------|---------------|
| Cutoff values (kcal/mol) | AS160 (%) | TBC1D1 (%) | Cutoff values (kcal/mol) | AS160 (%) | TBC1D1 (%) |
| 71.05 | 7.69 | 0.00 | 207.53 | 7.69 | 0.00 |
| 71.48 | 15.38 | 0.00 | 219.03 | 15.38 | 0.00 |
| 71.85 | 15.38 | 7.69 | 223.49 | 23.08 | 0.00 |
| 74.43 | 15.38 | 15.38 | 225.27 | 23.08 | 7.69 |
| 75.99 | 15.38 | 23.08 | 236.20 | 30.77 | 7.69 |
| 76.88 | 23.08 | 23.08 | 243.13 | 30.77 | 15.38 |
| 82.39 | 23.08 | 30.77 | 244.83 | 38.46 | 15.38 |
| 89.94 | 23.08 | 38.46 | 254.41 | 38.46 | 23.08 |
| 91.41 | 23.08 | 46.15 | 261.18 | 38.46 | 30.77 |
| 97.69 | 23.08 | 53.85 | 265.90 | 46.15 | 30.77 |
| 97.99 | 23.08 | 61.54 | 269.32 | 53.85 | 30.77 |
| 98.68 | 23.08 | 69.23 | 269.86 | 61.54 | 30.77 |
| 98.98 | 23.08 | 76.92 | 269.94 | 69.23 | 30.77 |
| 104.41 | 30.77 | 76.92 | 270.49 | 69.23 | 38.46 |
| 106.34 | 38.46 | 76.92 | 281.94 | 76.92 | 38.46 |
| 107.96 | 46.15 | 76.92 | 287.08 | 84.62 | 38.46 |
| 115.16 | 46.15 | 84.62 | 287.84 | 92.31 | 38.46 |
| 122.72 | 53.85 | 84.62 | 292.34 | 92.31 | 46.15 |
| 125.20 | 61.54 | 84.62 | 292.75 | 92.31 | 53.85 |
| 125.84 | 69.23 | 84.62 | 293.33 | 92.31 | 61.54 |
| 128.88 | 76.92 | 84.62 | 293.50 | 100.00 | 61.54 |
| 136.84 | 76.92 | 92.31 | 294.53 | 100.00 | 69.23 |
| 137.82 | 84.62 | 92.31 | 296.87 | 100.00 | 76.92 |
| 140.10 | 92.31 | 92.31 | 300.00 | 100.00 | 84.62 |
| 143.11 | 92.31 | 100.00 | 300.60 | 100.00 | 92.31 |
| 144.65 | 100.00 | 100.00 | 315.56 | 100.00 | 100.00 |

제 4 장. 논의 및 결론

4.1 연구 결과 정리

이번 연구에서는, 단백질 도킹 프로그램 및 내부 에너지 계산 프로그램 등을 사용하여 AS160 그리고 TBC1D1의 Rab GAP 도메인과 각 Rab 단백질들 간의 결합 친화도를 계산하고, 이를 임의의 절사점을 기준으로 구분함으로써 전체 Rab 단백질들 중 Rab GAP 도메인과 상호 작용하는 단백질의 비율을 조사하였다. 그 결과, 단백질 도킹 프로그램으로 Hex를 사용했을 때와 ClusPro를 사용했을 때 모두, AS160의 Rab GAP 도메인과 TBC1D1의 Rab GAP 도메인의 각 Rab 단백질에 대한 상호 작용 에너지 값의 범위가 일정 부분 중복되는 양상을 보였다. 이는 두 Rab GAP 도메인의 구조가 유사하여, 결과적으로 Rab 단백질들과의 상호 작용 역시 어느 정도 유사한 양상을 보이기 때문인 것으로 추측된다. 다만, 상호 작용 여부를 판단할 수 있는 절사점을 설정할 근거가 이 연구만으로는 다소 부족하므로, 본 연구에서는 참고가 될 수 있는 다른 실험 연구의 결과를 인용함으로써 그 근거를 찾고자 한다.

4.2 AS160/TBC1D1 유전자의 발현을 억제하였던 기존 실험 연구에 대한 고찰

AS160 또는 TBC1D1 유전자의 발현을 완전히 억제하여 만든 녹아웃 마우스(knockout mouse)를 실험 연구의 대상으로 하여 AS160 그리고 TBC1D1의 역할을 밝히려는 연구는 이미 기존 연구자들에 의해 수 차례 진행된 바 있다. 그러나 대부분은 AS160 또는 TBC1D1 중 한 가지의 유전자 발현만을 억제하고 실험을 진행하였고, 그 결과 인슐린의 자극에 의한 포도당의 세포 내 수송이 감소하는 양상이 특정 조직에서만 나타났으며, 이로 인하여 혈중 포도당 농도는 대조군과 비교하여 큰 차이가 없는 것으로 확인된 경우가 대부분이었다(Lansey et al., 2012; Dokas et al., 2013; Wang et al., 2013). 이러한 이유로, 두 유전자의 기능을 정확히 파악하기 위해서 AS160과 TBC1D1 유전자의 발현을 동시에 억제하여 이중 녹아웃 마우스(double knockout mouse)를 만들고, 어느 정도의 기능 상실이 일어나는지를 연구하였던 한 연구의 결과를 소개하고자 한다(Chadt et al., 2014).

이 연구에서는 wild type, AS160-knockout mouse, TBC1D1-knockout mouse, 그리고 AS160/TBC1D1 double knockout mouse 등 총 4종류의 유전 형질을 가진 생쥐를 대상으로 실험 연구를 진행하였다. 우선 AS160-knockout mouse와 TBC1D1-knockout mouse의 경우에는 복강 내로 포도당을 주사하였을 때 혈중 포도당 농도의 변화 양상이 wild type과 비교하여 유의한 차이가 없었으며, 인슐린을 주사하였을 때에 혈중 포도당 농도가 감소하는 양상에 있어서도 유사한 양상을 보였다. 그러나 double knockout mouse의 경우에는 복강 내로 포도당을 주사하였을 때, 주사 후 동일 시간대를 기준으로 혈중 포도당 농도가 wild type에 비하여 높았으며,

인슐린 주사 시에도 혈중 포도당 농도의 감소폭이 wild type에 비하여 떨어지는 양상을 보였다. 이는 double knockout mouse의 경우 생체 내의 포도당 항상성이 유지되지 않음을 시사한다.

그 다음으로, 근육 조직이 포도당을 세포 내로 수송하는 과정에 어떠한 변화가 있는지를 확인하는 실험이 수행되었다. 그 결과, 해당성 근육(glycolytic muscle)인 EDL 근육의 경우 외부 자극이 없는 상태에서는 wild type과 knockout mouse 간에 포도당의 세포 내 수송량에 차이가 없었으나, 인슐린에 의하여 자극을 받는 상태에서는 TBC1D1-knockout mouse와 double knockout mouse의 경우 wild type과 비교하여 포도당의 세포 내 수송량이 통계적으로 유의하게 감소하는 양상을 보였다. 반면에 유산소성 근육(oxidative muscle)인 soleus 근육의 경우, 인슐린에 의하여 자극을 받는 상태에서는 AS160-knockout mouse와 double knockout mouse의 경우에서 wild type과 비교하여 포도당의 세포 내 수송량이 유의하게 감소하는 양상을 보였다. 여기에서 주목할 점은, 두 경우 모두에서 double knockout mouse의 경우 single knockout mouse와 비교하여 추가적인 포도당 수송량 감소는 없었다는 것이다.

위 실험 결과를 종합하여 볼 때 내릴 수 있는 결론은 다음과 같다. AS160과 TBC1D1은 둘 모두 생체 내에서 포도당의 대사 과정에 중요한 역할을 담당하며, 서로 다른 근육 조직에 분포함으로써 하나의 단백질에 이상이 생겨도 다른 유전자의 기능에 의해 포도당 항상성을 유지할 수 있는 상호 보완적인 관계라는 점이다. 다만 이 실험만으로는 두 단백질이 세포 내에서 구체적으로 어떠한 신호 전달 경로를 거쳐서 포도당의 안정적인 수송에 관여하는 지에 대해서 파악할 수는 없었다. 이러한 상황에서 본 연구의 서론 부분에서 제시하였던, Rab 단백질 중에서 AS160 또는 TBC1D1의 Rab GAP 도메인이 상호 작용하는 비율이 실제로

생체 내에서 AS160과 TBC1D1이 담당하는 포도당 수송의 양에 비례할 것이라는 가설이 참인지의 여부를, 두 연구의 결과를 비교 분석함으로써 판단하고자 한다.

4.3 기존 실험 연구로 도출된 절사점의 적용

4.2에서 언급한 실험 연구에 제시된 결과를 구체적인 수치로 정리하면 다음과 같다. 우선 AS160 또는 TBC1D1이 생체 내의 포도당 항상성과 관련하여 담당하고 있는 역할의 비율을 평가할 수 있는 지표로, 근육 조직에서 일정 시간 동안 세포 내로 포도당을 수송하는 양을 선택하였다. 첫 번째로, soleus 근육의 경우에는 wild type의 포도당 수송량은 20분 동안 4.4nmol/mg이며, AS160-knockout mouse의 포도당 수송량은 20분 동안 2.3nmol/mg로, AS160 단백질이 담당하고 있는 비율은 $(4.4-2.3)/4.4 = 47.72\%$ 로 확인되었다. 두 번째로, EDL 근육의 경우에는 wild type의 포도당 수송량은 20분 동안 5.4nmol/mg이며, TBC1D1-knockout mouse의 포도당 수송량은 20분 동안 2.8nmol/mg로, TBC1D1 단백질이 담당하고 있는 비율은 $(5.4-2.8)/5.4 = 48.15\%$ 로 확인되었다. 결론적으로 AS160과 TBC1D1이 세포 내로의 포도당 수송에 관여하는 비율은 각각 47.72%와 48.15%라고 할 수 있다.

이제, Table 3.5에 제시된 가상의 절사점 중에서 이 수치와 가장 유사한 값을 찾아보면, Hex의 경우에는 91.41kcal/mol (AS160: 23.08%, TBC1D1: 46.15%)가 이에 해당하고, ClusPro의 경우에는 265.90kcal/mol (AS160: 46.15%, TBC1D1: 30.77%)가 이에 해당함을 확인할 수 있다. 따라서, 앞으로는 두 절사점을 기준으로 하여 논의를 진행할 것이다.

4.4 AS160/TBC1D1 과 상호 작용 가능성이 높은 Rab 단백질의 결정

마지막으로, 4.3에서 결정한 절사점을 기준으로 하였을 때, 어떠한 종류의 Rab 단백질이 AS160 또는 TBC1D1의 Rab GAP 도메인과 상호 작용 가능성이 높은지를 알아보았다. 첫 번째로, Hex 프로그램의 결과에 따라서 절사점을 91.41kcal/mol로 정하였을 때 AS160의 Rab GAP 도메인과 상호 작용 가능성이 높은 Rab 단백질로는 Rab1A, Rab2A, Rab11A가 있으며, TBC1D1의 Rab GAP 도메인과 상호 작용 가능성이 높은 Rab 단백질로는 Rab1A, Rab2A, Rab4A, Rab4B, Rab8A, Rab18이 있다. 두 번째로, ClusPro 프로그램의 결과에 따라서 절사점을 265.90kcal/mol로 정하였을 때 AS160의 Rab GAP 도메인과 상호 작용 가능성이 높은 Rab 단백질로는 Rab1A, Rab5A, Rab7, Rab14, Rab18, Rab21이 있으며, TBC1D1의 Rab GAP 도메인과 상호 작용 가능성이 높은 Rab 단백질로는 Rab1A, Rab7, Rab14, Rab21이 있다. 이를 서론에 언급하였던 생체 외에서의 기존 실험 연구 결과와 비교하여 보자. AS160 및 TBC1D1의 Rab GAP 도메인의 GSV 내 Rab 단백질들에 대한 활성도를 측정한 결과, 기질로 작용할 가능성이 높은 Rab 단백질은 Rab2A, Rab8A, Rab8B, Rab10, Rab14였다(Miinea et al., 2005; Roach et al., 2007). PDB에 신뢰성 있는 단백질 구조가 제공되어 있지 않아서 이번 연구 대상에 포함되지 않았던 Rab8B와 Rab10을 제외한다면 Rab2A, Rab8A, Rab14가 남게 되며, 이 세 단백질은 이번 연구 결과 분석을 통하여 얻어진, 상호 작용 가능성이 높은 것으로 확인된 Rab 단백질의 목록에 포함되어 있다. 결론적으로 Rab 단백질들 중에서 AS160 또는 TBC1D1의 Rab GAP 도메인이 상호 작용하는 비율이, 실제로 생체 내에서 AS160과 TBC1D1이 담당하는 포도당 수송의 양에

비례할 것이라는 본 연구의 핵심 가설은 이 결과로 인하여 긍정적으로 증명되었다고 사료된다.

4.5 본 연구의 의의와 한계점

본 연구는, 현재 실험 연구를 통해서도 그 기능이 명확하게 밝혀지지 않은 AS160 및 TBC1D1이 세포 내 포도당 수송과 관련된 신호 전달 경로에서 담당할 것으로 예상되는 역할을, 생명정보학적 분석 기법을 통하여 제시하였다는 점에서 그 의의가 있다고 할 수 있다. 단백질 간의 상호 작용을 분석하고, 그 결과를 기존 실험 연구 결과와 연관시켜서 특정 단백질의 새로운 기능을 밝혀냈다는 점에서, 추후에 아직 완전히 밝혀지지 않은 당뇨병의 병태 생리를 규명하는 데에 있어서 실험 연구의 단서를 제공한다는 측면에서 시사점이 있는 연구라고 볼 수 있다. 특히 기존 실험 연구가 대부분 생쥐의 근육 조직을 연구 대상으로 하였던 것과 비교하여, 본 연구는 인간의 유전 정보만을 이용하였다는 장점이 있다. 그러나 본 연구가 실험 연구가 아님으로써 발생하는 연구 진행 및 결과 분석상의 한계점이 몇 가지 존재한다.

첫 번째로, 생명정보학적 분석 기법을 사용하여 단백질 도킹을 분석하는 과정은, 공개되어 있는 유전 정보를 이론적인 방법으로 처리하는 과정이므로 실제 생명체 내에서의 상황을 온전히 반영할 수 없다는 단점이 있다. 본 연구에서는 단백질 도킹 프로그램으로 Hex와 ClusPro를 사용하였지만, 이외에도 다양한 연구자들이 개발한 수많은 다른 단백질 도킹 프로그램이 있으며, 이들 각각은 단백질의 내부 에너지를 계산하는 서로 다른 알고리즘을 가지고 있다. 각 프로그램의 목적은 최대한 간결한

계산을 통하여 생명체 내에서 일어나는 단백질 도킹을 가능한 한 정확하게 예측하는 데에 있지만, 어느 정도의 오차는 항상 존재한다.

두 번째로, 현재 공개된 단백질 구조 자료의 부족으로 모든 Rab 단백질들을 본 연구 대상에 포함시키지 못하였다. 본 연구의 자료 수집 단계에서는 기존 실험 연구에서 GSV 내에 존재하는 것으로 알려진 Rab 단백질들의 구조를 PDB에서 검색하였으나, 18개의 Rab 단백질 중에서 Rab3A, Rab10, Rab27A, Rab27B, Rab35의 경우에는 단백질 구조가 알려져 있지 않거나, 인간이 아닌 다른 생물의 단백질 구조만이 밝혀져 있어 분석 과정에서 제외하였다. 이 중에서도 Rab10의 경우에는 생체 외에서 수행된 실험 연구 결과에서 AS160 및 TBC1D1의 Rab GAP 도메인의 기질로 작용할 가능성이 높은 것으로 밝혀졌고(Miinea et al., 2005; Roach et al., 2007), 실제로 지방 세포에서는 GSV와 결합하여 세포막까지 같이 이동하여 GSV를 세포막에 융합시키는 역할을 담당하는 것으로 알려졌다(Chen et al., 2012; Chen and Lippincott-Schwartz, 2013). 따라서 추후 인간 Rab10의 단백질 구조가 밝혀지고, 이후에 단백질 도킹 프로그램을 이용하여 같이 분석을 한다면 더 정확한 결과를 얻을 수 있을 것이다.

세 번째로, 본 연구에서는 전체 Rab 단백질 중에서 AS160 또는 TBC1D1의 Rab GAP 도메인과 상호 작용하는 단백질의 비율과, AS160 또는 TBC1D1 유전자의 기능을 억제하였을 경우에 포도당 수송 기능이 감소하는 비율이 비례할 것이라는 가설을 세우고 이를 검증하였다. 이 가설이 성립하기 위해서는, 모든 Rab 단백질들이 AS160 또는 TBC1D1의 Rab GAP 도메인과 상호 작용하기에 충분한 양으로 존재하고, 또한 접촉 기회가 균등해야 한다는 전제 조건이 필요하다. 그러나 실제 근육 조직 내에서 이러한 조건이 만족된다는 근거를 확인할 수는 없었으며, 이로 인하여 결과 해석 과정에서

약간의 오차가 발생하였을 가능성이 있다.

네 번째로, 4.2의 기존 실험 연구 결과 고찰에서 언급했듯이, 근육 조직의 종류에 따라서 AS160 또는 TBC1D1의 발현 정도가 다를 수 있으나, 본 연구에서는 이 차이를 반영할 수는 없었다. 따라서 본 연구에서 얻어진 결과 및 결론을 생체 내 조직에 그대로 적용하기에는 무리가 있고, 추후 실험 연구 시에 본 연구에서 AS160 또는 TBC1D1의 Rab GAP 도메인과 상호 작용할 가능성이 높을 것으로 예상되었던 Rab 단백질들의 기능에 대한 연구를 우선적으로 시행할 수 있는 단서를 제공했다는 데에 의의를 두어야 할 것이다.

마지막으로, 이번 연구 결과 분석 중 절사점을 선정하는 과정에서, 기존 연구 결과의 수치를 인용하였다. 그러나 이 수치가 절대적인 참값이라고는 이야기할 수 없다. AS160 또는 TBC1D1 유전자의 기능을 각각 억제하였을 때에 포도당 수송량이 얼마나 감소하는지를 측정하였던 다른 연구들의 결과를 살펴보면, TBC1D1이 EDL 근육에서 포도당 수송을 담당하고 있는 비율은 48.03%로 앞서 정리하였던 기존 연구 결과와 큰 차이가 없으나(Dokas et al., 2013), AS160이 soleus 근육에서 포도당 수송을 담당하고 있는 비율은 31.11~36.36%로 다소 차이를 보이고 있었다(Lansey et al., 2012; Wang et al., 2013). 앞서 언급한 연구 및 이 연구들 모두 AS160 또는 TBC1D1 단백질의 발현을 완전히 억제시킨 상태에서 진행된 연구로, 추후 동일한 조건에서의 후속 실험 연구가 더 수행되어야 할 것으로 보인다.

제 5 장. 요약 및 총론

5.1 연구 결과 요약 및 결론

근육 세포 및 지방 세포 내로 포도당을 수송하는 기전에 대해서, 기존 연구를 통해 이미 알려진 사실 및 본 연구를 통해 새로 밝혀진 사실을 종합하여 요약하면 다음과 같다.

전체 당뇨병의 90% 가량을 차지하는 제2형 당뇨병의 일차적인 원인은 근육 세포 및 지방 세포의 인슐린 저항성이다. 인슐린은 GLUT4의 발현, GSV의 생성과 분류, GLUT4의 세포막으로의 이동, 그리고 GSV와 세포막 간의 도킹 및 융합 등 GLUT4의 세포 내 이동 과정 전반에 관여하는데, 그 중에서도 TGN과의 동적 평형을 통하여 세포질 내에 머물러 있던 GSV를 세포막으로 이동시키는 신호 전달 경로는 정상적인 세포에서 가장 중요한 생리적 과정으로 추측되고 있다.

인슐린의 결합을 통해 활성화된 인슐린 수용체는 IRS와 PI3K를 순서대로 활성화시킨다. 활성화된 PI3K에 의하여 생성된 PI(3,4,5)P3은 Akt를 세포막 근처로 유도하고, 이후 PDK1과 mTORC2에 의하여 차례로 인산화되면서 활성화된다. 근육 세포의 경우에는 활성화된 Akt에 의해서 AS160 및 TBC1D1의 특정 모티프가 인산화됨으로써 Rab GAP 도메인의 불활성화를 유발하고, 그 결과 Rab 단백질에 결합된 GTP의 가수 분해를 억제하여 활성 상태로 유지함으로써 GSV의 세포막으로의 이동을 촉진한다. 이

과정에서 AS160의 경우에는 Rab8A와 상호 작용을 한다는 사실이 알려져 있으나, TBC1D1의 경우에는 어떠한 Rab 단백질과 상호 작용을 하는지, 그리고 TBC1D1의 정확한 역할이 무엇인지에 대해서는 명확히 알려진 바가 없었다. 따라서 본 연구에서는, AS160 및 TBC1D1이 유사한 도메인 구조를 가지고 있음에도 불구하고, GSV 내에 존재하는 여러 Rab 단백질과의 상호 작용 양상에 차이가 있으며, 전체 Rab 단백질 중 AS160 또는 TBC1D1과 상호 작용하는 Rab 단백질의 비율이 실제로 전체 포도당 수송량 중 각 단백질이 담당하는 포도당 수송량의 비율과 유사할 것이라는 가설을 세웠다. 그리고 PDB에 공개되어 있는 단백질의 구조 및 단백질 도킹 프로그램을 사용하여 이를 검증하는 과정을 거쳤다.

본 연구에서는 단백질 도킹 프로그램으로 Hex와 ClusPro를 사용하여 최적의 도킹 모형을 탐색하였고, 그 결과로 얻어진 각 단백질 복합체들의 상호 작용 에너지를 계산하였다. 그리고 기존 연구 결과를 분석하여 전체 포도당 수송량 중에서 AS160 및 TBC1D1이 각각 담당하는 포도당 수송량의 비율을 구하였고, 이를 본 연구 결과와 비교하여 실제 생체 내에서의 기전과 가장 유사할 것으로 예측되는 결사점을 선정한 후에, 해당 결사점에서 어떠한 Rab 단백질이 AS160 및 TBC1D1과 상호 작용하는지를 평가하였다. 그 결과, 생체 외에서 수행된 다른 연구 결과에서 AS160 및 TBC1D1의 기질로 작용할 가능성이 높다고 확인된 Rab 단백질들과 본 연구 결과를 통해 도출된 Rab 단백질들이 어느 정도 일치함을 확인할 수 있었다. 결론적으로, TBC1D1의 역할은 AS160과는 일부 다른 Rab 단백질과 상호 작용을 함으로써, 포도당 수송을 위한 GSV의 세포막으로의 이동 과정에서 AS160과 더불어 일정 역할을 담당한다고 볼 수 있다.

5.2 총론 및 제언

기존 연구와 구별되는 본 연구의 가장 큰 특징은, PDB에 공개되어 있는 단백질의 구조 중에서 인간 단백질의 구조만을 연구 대상으로 하였다는 점이다. 이와는 달리, 기존 실험 연구는 대부분 쥐의 지방 세포 또는 근육 세포를 대상으로 수행되었다. 인슐린과 관련된 세포 내 신호 전달 경로 연구의 궁극적인 목적이 당뇨병의 기전 규명 및 적절한 치료제의 개발에 있음을 생각해 볼 때, 쥐를 대상으로 한 실험 연구 결과를 인간에게 그대로 적용하기에는 무리가 있으며, 이러한 점에서 본 연구는 일반적인 실험만으로는 쉽게 결과를 얻을 수 없는 인간 세포에서의 단백질 간의 상호 작용 여부를, 컴퓨터 도킹 프로그램을 이용하여 예측함으로써 그 기능이 명확히 알려지지 않은 단백질의 잠재적인 역할을 제시하였다는 데에 그 의의가 있다. 이러한 연구 방법론은 비단 당뇨병에만 적용할 수 있는 것이 아니며, 구조는 밝혀져 있으나 기능이 알려져 있지 않은 다른 질병 관련 단백질의 역할을 제시하여 추후 실험 연구의 단서를 제공하는 데에도 사용될 수 있다. 그러나 고찰의 후반부에서 제시하였다시피 본 연구의 방법론에는 한계점이 존재하기 때문에, 이 연구 방법론을 적용하여 도출된 결과를 그대로 수용하는 것은 다소 위험성을 내포하고 있다. 이를 해결하기 위해서, 앞으로는 단백질 간의 상호 작용을 가능한 한 정확하게 예측할 수 있는 정확한 단백질 도킹 프로그램의 개발이 계속되어야 한다.

또한, 이번 연구만으로는 Rab GAP 도메인과 상호 작용 가능성이 높은 Rab 단백질들이 실제로 근육 세포 내에서 어떠한 작용을 거쳐서 GLUT4의 세포막으로의 이동 및 포도당 수송에 관여하는지에 대해서는 확인할 수 없었다. 그 동안 여러 가지 Rab 단백질의 기능에 관한 연구가 일부 이루어져 있기는 하나 아직 부족한 실정이다(Chen et al., 2012; Reed et al., 2013; Sun et al., 2014).

따라서 GLUT4의 세포막으로의 이동과 관련된 기전을 더욱 자세히 이해하기 위해서는 이에 대한 후속 연구가 진행되어야 한다. 또한 AS160 및 TBC1D1 이외에도, 인슐린의 자극에 의해 활성화되어 포도당 수송 과정에 관여하는 단백질에는 서론에서 언급하였다시피 여러 가지가 있으며, 이들 중에서 아직 그 작용 기전이 명확히 밝혀지지 않은 단백질에 대해서도, 본 연구의 방법론이나 실험 연구의 일반적인 방법론을 사용한 지속적인 연구가 필요하다. 이를 통하여 앞으로 당뇨병의 근본적인 병태 생리를 이해하는 데에 중요한 단서를 얻을 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

Abbott MJ, Bogachus LD, Turcotte LP. AMPK α 2 deficiency uncovers time dependency in the regulation of contraction-induced palmitate and glucose uptake in mouse muscle. *J Appl Physiol* (1985). 111(1): 125-134 (2011).

Abbott MJ, Edelman AM, Turcotte LP. CaMKK is an upstream signal of AMP-activated protein kinase in regulation of substrate metabolism in contracting skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 297(6): R1724-1732 (2009).

Alexandru G, Graumann J, Smith GT, Kolawa NJ, Fang R, Deshaies RJ. UBXD7 binds multiple ubiquitin ligases and implicates p97 in HIF1 α turnover. *Cell* 134(5): 804-816 (2008).

American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care* 37 Suppl 1: S14-80 (2014).

Bai L, Wang Y, Fan J, Chen Y, Ji W, Qu A, Xu P, James DE, Xu T. Dissecting multiple steps of GLUT4 trafficking and identifying the sites of insulin action. *Cell Metab*. 5(1): 47-57 (2007).

Balon TW, Nadler JL. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 82(1): 359-363 (1997).

Bandyopadhyay G, Standaert ML, Sajan MP, Karnitz LM, Cong L, Quon MJ, Farese RV. Dependence of insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation on 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and its target threonine-410 in the activation loop of protein kinase C- ζ . *Mol Endocrinol*. 13(10): 1766-1772 (1999).

Baumann CA, Ribon V, Kanzaki M, Thurmond DC, Mora S, Shigematsu S, Bickel PE, Pessin JE, Saltiel AR. CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* 407(6801): 202-207 (2000).

Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*. 28(1): 235-242 (2000).

Birk JB, Wojtaszewski JF. Predominant α 2/ β 2/ γ 3 AMPK activation during exercise in human skeletal muscle. *J Physiol*. 577(Pt 3): 1021-1032 (2006).

Blot V, McGraw TE. Molecular mechanisms controlling GLUT4 intracellular retention. *Mol Biol Cell*. 19(8): 3477-3487 (2008).

Bogan JS, Hendon N, McKee AE, Tsao TS, Lodish HF. Functional cloning of TUG as a regulator of GLUT4 glucose transporter trafficking. *Nature* 425(6959): 727-733 (2003).

Bogan JS, Kandror KV. Biogenesis and regulation of insulin-responsive vesicles containing GLUT4. *Curr Opin Cell Biol*. 22(4): 506-512 (2010).

Braun P, Gingras AC. History of protein-protein interactions: from egg-white to complex networks. *Proteomics* 12(10): 1478-1498 (2012).

Broberg S, Sahlin K. Adenine nucleotide degradation in human skeletal muscle during prolonged exercise. *J Appl Physiol* (1985). 67(1): 116-122 (1989).

Brozinick JT Jr, Berkemeier BA, Elmendorf JS. Acting on GLUT4: membrane & cytoskeletal components of insulin action. *Curr Diabetes Rev*. 3(2): 111-122 (2007).

Bruss MD, Arias EB, Lienhard GE, Cartee GD. Increased phosphorylation of Akt substrate of 160 kDa (AS160) in rat skeletal muscle in response to insulin or contractile activity. *Diabetes* 54(1): 41-50 (2005).

Bryant NJ, Govers R, James DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3(4): 267-277 (2002).

Chadt A, Immisch A, de Wendt C, Springer C, Zhou Z, Stermann T, Holman GD, Loffing-Cueni D, Loffing J, Joost HG, Al-Hasani H. Deletion of both Rab-GTPase activating proteins TBC1D1 and TBC1D4 in mice eliminates insulin- and AICAR-stimulated glucose transport. *Diabetes* 64(3): 746-759 (2015).

Chang L, Chiang SH, Saltiel AR. TC10 α is required for insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *Endocrinology* 148(1): 27-33 (2007).

Chen G, Raman P, Bhonagiri P, Strawbridge AB, Pattar GR, Elmendorf JS. Protective effect of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate against cortical filamentous actin loss and insulin resistance induced by sustained exposure of 3T3-L1 adipocytes to insulin. *J Biol Chem*. 279(38): 39705-39709 (2004).

Chen XW, Leto D, Chiang SH, Wang Q, Saltiel AR. Activation of RalA is required for insulin-stimulated Glut4 trafficking to the plasma membrane via the exocyst and the motor protein Myo1c. *Dev Cell*. 13(3): 391-404 (2007).

Chen Y, Lippincott-Schwartz J. Rab10 delivers GLUT4 storage vesicles to the plasma membrane. *Commun Integr Biol.* 6(3): e23779 (2013).

Chen Y, Wang Y, Zhang J, Deng Y, Jiang L, Song E, Wu XS, Hammer JA, Xu T, Lippincott-Schwartz J. Rab10 and myosin-Va mediate insulin-stimulated GLUT4 storage vesicle translocation in adipocytes. *J Cell Biol.* 198(4): 545-560 (2012).

Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT, Neudauer CL, Macara IG, Pessin JE, Saltiel AR. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* 410(6831): 944-948 (2001).

Chuang GY, Kozakov D, Brenke R, Comeau SR, Vajda S. DARS (Decoys As the Reference State) potentials for protein-protein docking. *Biophys J.* 95(9): 4217-4227 (2008).

Chunqiu Hou J, Pessin JE. Lipid Raft targeting of the TC10 amino terminal domain is responsible for disruption of adipocyte cortical actin. *Mol Biol Cell.* 14(9): 3578-3591 (2003).

Cormont M, Gautier N, Ilc K, le Marchand-Brustel Y. Expression of a prenylation-deficient Rab4 inhibits the GLUT4 translocation induced by active phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B. *Biochem J.* 356(Pt 1): 143-149 (2001).

Czech MP, Corvera S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem.* 274(4): 1865-1868 (1999).

D'Souza-Schorey C, Chavrier P. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(5): 347-358 (2006).

Doege H, Schürmann A, Ohnimus H, Monser V, Holman GD, Joost HG. Serine-294 and threonine-295 in the exofacial loop domain between helices 7 and 8 of glucose transporters (GLUT) are involved in the conformational alterations during the transport process. *Biochem J.* 329 (Pt 2): 289-293 (1998).

Dokas J, Chadt A, Nolden T, Himmelbauer H, Zierath JR, Joost HG, Al-Hasani H. Conventional knockout of Tbc1d1 in mice impairs insulin- and AICAR-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. *Endocrinology* 154(10): 3502-3514 (2013).

Downes CP, Gray A, Lucocq JM. Probing phosphoinositide functions in signaling and membrane trafficking. *Trends Cell Biol.* 15(5): 259-268 (2005).

Dugani CB, Klip A. Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies. *EMBO Rep.* 6(12): 1137-1142 (2005).

Eathiraj S, Pan X, Ritacco C, Lambright DG. Structural basis of family-wide Rab GTPase recognition by rabenosyn-5. *Nature* 436(7049): 415-419 (2005).

Egawa T, Hamada T, Ma X, Karaike K, Kameda N, Masuda S, Iwanaka N, Hayashi T. Caffeine activates preferentially $\alpha 1$ -isoform of 5'AMP-activated protein kinase in rat skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)*. 201(2): 227-238 (2011).

Esk C, Chen CY, Johannes L, Brodsky FM. The clathrin heavy chain isoform CHC22 functions in a novel endosomal sorting step. *J Cell Biol.* 188(1): 131-144 (2010).

Etgen GJ Jr, Fryburg DA, Gibbs EM. Nitric oxide stimulates skeletal muscle glucose transport through a calcium/contraction- and phosphatidylinositol-3-kinase-independent pathway. *Diabetes* 46(11): 1915-1919 (1997).

Eyster CA, Duggins QS, Gorbisky GJ, Olson AL. Microtubule network is required for insulin signaling through activation of Akt/protein kinase B: evidence that insulin stimulates vesicle docking/fusion but not intracellular mobility. *J Biol Chem.* 281(51): 39719-39727 (2006).

Eyster CA, Olson AL. Compartmentalization and regulation of insulin signaling to GLUT4 by the cytoskeleton. *Vitam Horm.* 80: 193-215 (2009).

Filippa N, Sable CL, Hemmings BA, Van Obberghen E. Effect of phosphoinositide-dependent kinase 1 on protein kinase B translocation and its subsequent activation. *Mol Cell Biol.* 20(15): 5712-5721 (2000).

Foti M, Porcheron G, Fournier M, Maeder C, Carpentier JL. The neck of caveolae is a distinct plasma membrane subdomain that concentrates insulin receptors in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(4): 1242-1247 (2007).

Fujita A, Cheng J, Fujimoto T. Quantitative electron microscopy for the nanoscale analysis of membrane lipid distribution. *Nat Protoc.* 5(4): 661-669 (2010).

Gabb HA, Jackson RM, Sternberg MJ. Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information. *J Mol Biol.* 272(1): 106-120 (1997).

Ganley IG, Espinosa E, Pfeffer SR. A syntaxin 10-SNARE complex distinguishes two distinct transport routes from endosomes to the trans-Golgi in human cells. *J Cell Biol.* 180(1): 159-172 (2008).

Giorgino F, de Robertis O, Laviola L, Montrone C, Perrini S, McCowen KC, Smith RJ. The sentrin-conjugating enzyme mUbc9 interacts with GLUT4 and GLUT1 glucose transporters and regulates transporter levels in skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(3): 1125-1130 (2000).

Gonzalez E, McGraw TE. Insulin signaling diverges into Akt-dependent and -independent signals to regulate the recruitment/docking and the fusion of GLUT4 vesicles to the plasma membrane. *Mol Biol Cell*. 17(10): 4484-4493 (2006).

Govers R, Coster AC, James DE. Insulin increases cell surface GLUT4 levels by dose dependently discharging GLUT4 into a cell surface recycling pathway. *Mol Cell Biol*. 24(14): 6456-6466 (2004).

Grusovin J, Macaulay SL. Snares for GLUT4--mechanisms directing vesicular trafficking of GLUT4. *Front Biosci*. 8: d620-641 (2003).

Guo Z, Hou X, Goody RS, Itzen A. Intermediates in the guanine nucleotide exchange reaction of Rab8 protein catalyzed by guanine nucleotide exchange factors Rabin8 and GRAB. *J Biol Chem*. 288(45): 32466-32474 (2013).

Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(10): 774-785 (2007).

Hatakeyama H, Kanzaki M. Regulatory mode shift of Tbc1d1 is required for acquisition of insulin-responsive GLUT4-trafficking activity. *Mol Biol Cell*. 24(6): 809-817 (2013).

Herman MA, Kahn BB. Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *J Clin Invest*. 116(7): 1767-1775 (2006).

Higaki Y, Hirshman MF, Fujii N, Goodyear LJ. Nitric oxide increases glucose uptake through a mechanism that is distinct from the insulin and contraction pathways in rat skeletal muscle. *Diabetes* 50(2): 241-247 (2001).

Hodgkinson CP, Mander A, Sale GJ. Protein kinase-zeta interacts with munc18c: role in GLUT4 trafficking. *Diabetologia* 48(8): 1627-1636 (2005).

Holloszy JO, Narahara HT. Studies of tissue permeability. X. Changes in permeability to 3-methylglucose associated with contraction of isolated frog muscle. *J Biol Chem*. 240(9): 3493-3500 (1965).

Holloszy JO, Narahara HT. Nitrate ions: Potentiation of increased permeability to

sugar associated with muscle contraction. *Science* 155(3762): 573-575 (1967).

Holmes BF, Sparling DP, Olson AL, Winder WW, Dohm GL. Regulation of muscle GLUT4 enhancer factor and myocyte enhancer factor 2 by AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 289(6): E1071-1076 (2005).

Holmes B, Dohm GL. Regulation of GLUT4 gene expression during exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 36(7): 1202-1206 (2004).

Hou JC, Suzuki N, Pessin JE, Watson RT. A specific dileucine motif is required for the GGA-dependent entry of newly synthesized insulin-responsive aminopeptidase into the insulin-responsive compartment. *J Biol Chem.* 281(44): 33457-33466 (2006).

Hruz PW, Mueckler MM. Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review). *Mol Membr Biol.* 18(3): 183-193 (2001).

Huang J, Imamura T, Olefsky JM. Insulin can regulate GLUT4 internalization by signaling to Rab5 and the motor protein dynein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(23): 13084-13089 (2001).

Huang P, Altshuller YM, Hou JC, Pessin JE, Frohman MA. Insulin-stimulated plasma membrane fusion of Glut4 glucose transporter-containing vesicles is regulated by phospholipase D1. *Mol Biol Cell.* 16(6): 2614-2623 (2005).

Huang S, Czech MP. The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab.* 5(4): 237-252 (2007).

Huang SY. Search strategies and evaluation in protein-protein docking: principles, advances and challenges. *Drug Discov Today.* 19(8): 1081-1096 (2014).

Huang SY. Exploring the potential of global protein-protein docking: an overview and critical assessment of current programs for automatic ab initio docking. *Drug Discov Today.* (2015)

Huber SK, Scheidig AJ. High resolution crystal structures of human Rab4a in its active and inactive conformations. *FEBS Lett.* 579(13): 2821-2829 (2005).

Hussey SE, McGee SL, Garnham A, McConell GK, Hargreaves M. Exercise increases skeletal muscle GLUT4 gene expression in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 14(8): 768-771 (2012).

Inoue M, Chang L, Hwang J, Chiang SH, Saltiel AR. The exocyst complex is required for targeting of Glut4 to the plasma membrane by insulin. *Nature* 422(6932): 629-633

(2003).

Inoue M, Chiang SH, Chang L, Chen XW, Saltiel AR. Compartmentalization of the exocyst complex in lipid rafts controls Glut4 vesicle tethering. *Mol Biol Cell*. 17(5): 2303-2311 (2006).

Ishikura S, Bilan PJ, Klip A. Rabs 8A and 14 are targets of the insulin-regulated Rab-GAP AS160 regulating GLUT4 traffic in muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 353(4): 1074-1079 (2007).

Jedrychowski MP, Gartner CA, Gygi SP, Zhou L, Herz J, Kandror KV, Pilch PF. Proteomic analysis of GLUT4 storage vesicles reveals LRP1 to be an important vesicle component and target of insulin signaling. *J Biol Chem*. 285(1): 104-114 (2010).

Jensen TE, Richter EA. Ca²⁺ release stimulates very little skeletal muscle glucose uptake independent of ATP-turnover and AMPK. *Diabetes* (2010).

Jensen TE, Rose AJ, Hellsten Y, Wojtaszewski JF, Richter EA. Caffeine-induced Ca(2+) release increases AMPK-dependent glucose uptake in rodent soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 293(1): E286-292 (2007).

Jensen TE, Rose AJ, Jørgensen SB, Brandt N, Schjerling P, Wojtaszewski JF, Richter EA. Possible CaMKK-dependent regulation of AMPK phosphorylation and glucose uptake at the onset of mild tetanic skeletal muscle contraction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 292(5): E1308-1317 (2007).

Jensen TE, Schjerling P, Viollet B, Wojtaszewski JF, Richter EA. AMPK α 1 activation is required for stimulation of glucose uptake by twitch contraction, but not by H₂O₂, in mouse skeletal muscle. *PLoS One*. 3(5): e2102 (2008).

Jiang L, Fan J, Bai L, Wang Y, Chen Y, Yang L, Chen L, Xu T. Direct quantification of fusion rate reveals a distal role for AS160 in insulin-stimulated fusion of GLUT4 storage vesicles. *J Biol Chem*. 283(13): 8508-8516 (2008).

Jiang ZY, Chawla A, Bose A, Way M, Czech MP. A phosphatidylinositol 3-kinase-independent insulin signaling pathway to N-WASP/Arp2/3/F-actin required for GLUT4 glucose transporter recycling. *J Biol Chem*. 277(1): 509-515 (2002).

Joost HG, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol*. 18(4): 247-256 (2001).

Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 46(1): 3-19 (2003).

Kane S, Sano H, Liu SC, Asara JM, Lane WS, Garner CC, Lienhard GE. A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain. *J Biol Chem.* 277(25): 22115-22118 (2002).

Kanzaki M, Pessin JE. Insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes is dependent upon cortical actin remodeling. *J Biol Chem.* 276(45): 42436-42444 (2001).

Kanzaki M, Pessin JE. Caveolin-associated filamentous actin (Cav-actin) defines a novel F-actin structure in adipocytes. *J Biol Chem.* 277(29): 25867-25869 (2002).

Karylowski O, Zeigerer A, Cohen A, McGraw TE. GLUT4 is retained by an intracellular cycle of vesicle formation and fusion with endosomes. *Mol Biol Cell.* 15(2): 870-882 (2004).

Katchalski-Katzir E, Shariv I, Eisenstein M, Friesem AA, Aflalo C, Vakser IA. Molecular surface recognition: determination of geometric fit between proteins and their ligands by correlation techniques. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(6): 2195-2199 (1992).

Khan AH, Capilla E, Hou JC, Watson RT, Smith JR, Pessin JE. Entry of newly synthesized GLUT4 into the insulin-responsive storage compartment is dependent upon both the amino terminus and the large cytoplasmic loop. *J Biol Chem.* 279(36): 37505-37511 (2004).

Kooijman EE, Chupin V, de Kruijff B, Burger KN. Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Traffic* 4(3): 162-174 (2003).

Koumanov F, Jin B, Yang J, Holman GD. Holman. Insulin signaling meets vesicle traffic of GLUT4 at a plasma-membrane-activated fusion step. *Cell Metab.* 2(3): 179-189 (2005).

Kozakov D, Brenke R, Comeau SR, Vajda S. PIPER: an FFT-based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins* 65(2): 392-406 (2006).

Kozakov D, Clodfelter KH, Vajda S, Camacho CJ. Optimal clustering for detecting near-native conformations in protein docking. *Biophys J.* 89(2): 867-875 (2005).

Kramer HF, Taylor EB, Witczak CA, Fujii N, Hirshman MF, Goodyear LJ.

Calmodulin-binding domain of AS160 regulates contraction- but not insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. *Diabetes* 56(12): 2854-2862 (2007).

Kupriyanova TA, Kandror V, Kandror KV. Isolation and characterization of the two major intracellular Glut4 storage compartments. *J Biol Chem.* 277(11): 9133-9138 (2002).

Kwik J, Boyle S, Fooksman D, Margolis L, Sheetz MP, Edidin M. Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(24): 13964-13969 (2003).

Lalioti VS, Vergarajauregui S, Pulido D, Sandoval IV. The insulin-sensitive glucose transporter, GLUT4, interacts physically with Daxx. Two proteins with capacity to bind Ubc9 and conjugated to SUMO1. *J Biol Chem.* 277(22): 19783-19791 (2002).

Lansey MN, Walker NN, Hargett SR, Stevens JR, Keller SR. Deletion of Rab GAP AS160 modifies glucose uptake and GLUT4 translocation in primary skeletal muscles and adipocytes and impairs glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 303(10): E1273-1286 (2012).

Lee JS, Kim JH, Jang IH, Kim HS, Han JM, Kazlauskas A, Yagisawa H, Suh PG, Ryu SH. Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate specifically interacts with the phox homology domain of phospholipase D1 and stimulates its activity. *J Cell Sci.* 118(Pt 19): 4405-4413 (2005).

Li J, Peters PJ, Bai M, Dai J, Bos E, Kirchhausen T, Kandror KV, Hsu VW. An ACAP1-containing clathrin coat complex for endocytic recycling. *J Cell Biol.* 178(3): 453-464 (2007).

Li LV, Bakirtzi K, Watson RT, Pessin JE, Kandror KV. The C-terminus of GLUT4 targets the transporter to the perinuclear compartment but not to the insulin-responsive vesicles. *Biochem J.* 419(1): 105-112 (2009).

Li LV, Kandror KV. Golgi-localized, gamma-ear-containing, Arf-binding protein adaptors mediate insulin-responsive trafficking of glucose transporter 4 in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol.* 19(8): 2145-2153 (2005).

Liu J, DeYoung SM, Hwang JB, O'Leary EE, Saltiel AR. The roles of Cbl-b and c-Cbl in insulin-stimulated glucose transport. *J Biol Chem.* 278(38): 36754-36762 (2003).

Liu J, Kimura A, Baumann CA, Saltiel AR. APS facilitates c-Cbl tyrosine phosphorylation and GLUT4 translocation in response to insulin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol.* 22(11): 3599-3609 (2002).

Liu L, Jedrychowski MP, Gygi SP, Pilch PF. Role of insulin-dependent cortical fodrin/spectrin remodeling in glucose transporter 4 translocation in rat adipocytes. *Mol Biol Cell*. 17(10): 4249-4256 (2006).

Liu LB, Omata W, Kojima I, Shibata H. The SUMO conjugating enzyme Ubc9 is a regulator of GLUT4 turnover and targeting to the insulin-responsive storage compartment in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 56(8): 1977-1985 (2007).

Liu ML, Olson AL, Moya-Rowley WS, Buse JB, Bell GI, Pessin JE. Expression and regulation of the human GLUT4/muscle-fat facilitative glucose transporter gene in transgenic mice. *J Biol Chem*. 267(17): 11673-11676 (1992).

Lizunov VA, Matsumoto H, Zimmerberg J, Cushman SW, Frolov VA. Frolov. Insulin stimulates the halting, tethering, and fusion of mobile GLUT4 vesicles in rat adipose cells. *J Cell Biol*. 169(3): 481-489 (2005).

Macindoe G, Mavridis L, Venkatraman V, Devignes MD, Ritchie DW. HexServer: an FFT-based protein docking server powered by graphics processors. *Nucleic Acids Res*. 38(Web Server issue): W445-449 (2010).

Macpherson P, Kostrominova T, Tang H, Goldman D. Protein kinase C and calcium/calmodulin-activated protein kinase II (CaMK II) suppress nicotinic acetylcholine receptor gene expression in mammalian muscle. A specific role for CaMK II in activity-dependent gene expression. *J Biol Chem*. 277(18): 15638-15646 (2002).

Mandell JG, Roberts VA, Pique ME, Kotlovyi V, Mitchell JC, Nelson E, Tsigelny I, Ten Eyck LF. Protein docking using continuum electrostatics and geometric fit. *Protein Eng*. 14(2): 105-113 (2001).

McCarthy AM, Spisak KO, Brozinick JT, Elmendorf JS. Loss of cortical actin filaments in insulin-resistant skeletal muscle cells impairs GLUT4 vesicle trafficking and glucose transport. *Am J Physiol Cell Physiol*. 291(5): C860-868 (2006).

McCray BA, Skordalakes E, Taylor JP. Disease mutations in Rab7 result in unregulated nucleotide exchange and inappropriate activation. *Hum Mol Genet*. 19(6): 1033-1047 (2010).

McGee SL, van Denderen BJ, Howlett KF, Mollica J, Schertzer JD, Kemp BE, Hargreaves M. AMP-activated protein kinase regulates GLUT4 transcription by phosphorylating histone deacetylase 5. *Diabetes* 57(4): 860-867 (2008).

Merry TL, Dywer RM, Bradley EA, Rattigan S, McConell GK. Local hindlimb antioxidant infusion does not affect muscle glucose uptake during in situ contractions in rat. *J Appl Physiol* (1985). 108(5): 1275-1283 (2010).

Merry TL, Steinberg GR, Lynch GS, McConell GK. Skeletal muscle glucose uptake during contraction is regulated by nitric oxide and ROS independently of AMPK. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 298(3): E577-585 (2010).

Merry TL, Wadley GD, Stathis CG, Garnham AP, Rattigan S, Hargreaves M, McConell GK. N-Acetylcysteine infusion does not affect glucose disposal during prolonged moderate-intensity exercise in humans. *J Physiol*. 588(Pt 9): 1623-1634 (2010).

Mñinea CP, Sano H, Kane S, Sano E, Fukuda M, Peränen J, Lane WS, Lienhard GE. AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. *Biochem J*. 391(Pt 1): 87-93 (2005).

Mueckler M, Weng W, Kruse M. Glutamine 161 of Glut1 glucose transporter is critical for transport activity and exofacial ligand binding. *J Biol Chem*. 269(32): 20533-20538 (1994).

Myers MG Jr, Backer JM, Sun XJ, Shoelson S, Hu P, Schlessinger J, Yoakim M, Schaffhausen B, White MF. IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(21): 10350-10354 (1992).

Ojuka EO, Goyaram V, Smith JA. The role of CaMKII in regulating GLUT4 expression in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 303(3): E322-331 (2012).

Okada S, Yamada E, Saito T, Ohshima K, Hashimoto K, Yamada M, Uehara Y, Tsuchiya T, Shimizu H, Tatei K, Izumi T, Yamauchi K, Hisanaga S, Pessin JE, Mori M. CDK5-dependent phosphorylation of the Rho family GTPase TC10(alpha) regulates insulin-stimulated GLUT4 translocation. *J Biol Chem*. 283(51): 35455-35463 (2008).

Olson AL, Knight JB. Regulation of GLUT4 expression in vivo and in vitro. *Front Biosci*. 8: s401-409 (2003).

Olson AL, Pessin JE. Transcriptional regulation of the human GLUT4 gene promoter in diabetic transgenic mice. *J Biol Chem*. 270(40): 23491-23495 (1995).

Oshel KM, Knight JB, Cao KT, Thai MV, Olson AL. Identification of a 30-base pair

regulatory element and novel DNA binding protein that regulates the human GLUT4 promoter in transgenic mice. *J Biol Chem.* 275(31): 23666-23673 (2000).

Ottensmeyer FP, Beniac DR, Luo RZ, Yip CC. Mechanism of transmembrane signaling: insulin binding and the insulin receptor. *Biochemistry* 39(40): 12103-12112 (2000).

Park SY, Jin W, Woo JR, Shoelson SE. Crystal structures of human TBC1D1 and TBC1D4 (AS160) RabGTPase-activating protein (RabGAP) domains reveal critical elements for GLUT4 translocation. *J Biol Chem.* 286(20): 18130-18138 (2011).

Parton RG, Simons K. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(3): 185-194 (2007).

Peck GR, Chavez JA, Roach WG, Budnik BA, Lane WS, Karlsson HK, Zierath JR, Lienhard GE. Insulin-stimulated phosphorylation of the Rab GTPase-activating protein TBC1D1 regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem.* 284(44): 30016-30023 (2009).

Randhawa VK, Ishikura S, Talior-Volodarsky I, Cheng AW, Patel N, Hartwig JH, Klip A. GLUT4 vesicle recruitment and fusion are differentially regulated by Rac, AS160, and Rab8A in muscle cells. *J Biol Chem.* 283(40): 27208-27219 (2008).

Raney MA, Turcotte LP. Evidence for the involvement of CaMKII and AMPK in Ca²⁺-dependent signaling pathways regulating FA uptake and oxidation in contracting rodent muscle. *J Appl Physiol* (1985). 104(5): 1366-1373 (2008).

Reed SE, Hodgson LR, Song S, May MT, Kelly EE, McCaffrey MW, Mastick CC, Verkade P, Tavaré JM. A role for Rab14 in the endocytic trafficking of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Sci.* 126(Pt 9): 1931-1941 (2013).

Reid MB. Free radicals and muscle fatigue: Of ROS, canaries, and the IOC. *Free Radic Biol Med.* 44(2): 169-179 (2008).

Ribon V, Printen JA, Hoffman NG, Kay BK, Saltiel AR. A novel, multifunctional c-Cbl binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol.* 18(2): 872-879 (1998).

Ribon V, Saltiel AR. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J.* 324 (Pt 3): 839-845 (1997).

Richter EA, Hargreaves M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake.

Physiol Rev. 93(3): 993-1017 (2013).

Ritchie DW, Kemp GJ. Protein docking using spherical polar Fourier correlations. *Proteins* 39(2): 178-194 (2000).

Ritchie DW, Kozakov D, Vajda S. Accelerating and focusing protein-protein docking correlations using multi-dimensional rotational FFT generating functions. *Bioinformatics* 24(17): 1865-1873 (2008).

Roach WG, Chavez JA, Múnea CP, Lienhard GE. Substrate specificity and effect on GLUT4 translocation of the Rab GTPase-activating protein Tbc1d1. *Biochem J.* 403(2): 353-358 (2007).

Roberts CK, Barnard RJ, Scheck SH, Balon TW. Exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle is nitric oxide dependent. *Am J Physiol.* 273(1 Pt 1): E220-225 (1997).

Rose AJ, Broholm C, Kiillerich K, Finn SG, Proud CG, Rider MH, Richter EA, Kiens B. Exercise rapidly increases eukaryotic elongation factor 2 phosphorylation in skeletal muscle of men. *J Physiol.* 569(Pt 1): 223-228 (2005).

Rose AJ, Kiens B, Richter EA. Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase expression and signalling in skeletal muscle during exercise. *J Physiol.* 574(Pt 3): 889-903 (2006).

Rose AJ, Richter EA. Skeletal muscle glucose uptake during exercise: how is it regulated? *Physiology (Bethesda)* 20: 260-270 (2005).

Rottman JN, Bracy D, Malabanan C, Yue Z, Clanton J, Wasserman DH. Contrasting effects of exercise and NOS inhibition on tissue-specific fatty acid and glucose uptake in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 283(1): E116-123 (2002).

Rubin BR, Bogan JS. Intracellular retention and insulin-stimulated mobilization of GLUT4 glucose transporters. *Vitam Horm.* 80: 155-192 (2009).

Sakamoto K, Holman GD. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295(1): E29-37 (2008).

Sandström ME, Zhang SJ, Bruton J, Silva JP, Reid MB, Westerblad H, Katz A. Role of reactive oxygen species in contraction-mediated glucose transport in mouse skeletal muscle. *J Physiol.* 575(Pt 1): 251-262 (2006).

Sano H, Kane S, Sano E, Múnea CP, Asara JM, Lane WS, Garner CW, Lienhard GE.

Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem.* 278(17): 14599-14602 (2003).

Sano H, Roach WG, Peck GR, Fukuda M, Lienhard GE. Rab10 in insulin-stimulated GLUT4 translocation. *Biochem J.* 411(1): 89-95 (2008).

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307(5712): 1098-1101 (2005).

Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Ingelsson E, Lawlor DA, Selvin E, Stampfer M, Stehouwer CD, Lewington S, Pennells L, Thompson A, Sattar N, White IR, Ray KK, Danesh J. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet* 375(9733): 2215-2222 (2010).

Scapin SM, Carneiro FR, Alves AC, Medrano FJ, Guimarães BG, Zanchin NI. The crystal structure of the small GTPase Rab11b reveals critical differences relative to the Rab11a isoform. *J Struct Biol.* 154(3): 260-268 (2006).

Schertzer JD, Antonescu CN, Bilan PJ, Jain S, Huang X, Liu Z, Bonen A, Klip A. A transgenic mouse model to study glucose transporter 4myc regulation in skeletal muscle. *Endocrinology* 150(4): 1935-1940 (2009).

Schuberth C, Buchberger A. UBX domain proteins: major regulators of the AAA ATPase Cdc48/p97. *Cell Mol Life Sci.* 65(15): 2360-2371 (2008).

Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, Nys R, Rousseau F, Serrano L. The FoldX web server: an online force field. *Nucleic Acids Res.* 33(Web Server issue): W382-388 (2005).

Seshasai SR, Kaptoge S, Thompson A, Di Angelantonio E, Gao P, Sarwar N, Whincup PH, Mukamal KJ, Gillum RF, Holme I, Njølstad I, Fletcher A, Nilsson P, Lewington S, Collins R, Gudnason V, Thompson SG, Sattar N, Selvin E, Hu FB, Danesh J. Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. *N Engl J Med.* 364(9): 829-841 (2011).

Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 87(1): 4-14 (2010).

Shi J, Huang G, Kandror KV. Self-assembly of Glut4 storage vesicles during differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 283(44): 30311-30321 (2008).

Shi J, Kandror KV. Sortilin is essential and sufficient for the formation of Glut4

storage vesicles in 3T3-L1 adipocytes. *Dev Cell*. 9(1): 99-108 (2005).

Sinha MK, Raineri-Maldonado C, Buchanan C, Pories WJ, Carter-Su C, Pilch PF, Caro JF. Adipose tissue glucose transporters in NIDDM. Decreased levels of muscle/fat isoform. *Diabetes* 40(4): 472-477 (1991).

Song XM, Fiedler M, Galuska D, Ryder JW, Fernström M, Chibalin AV, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside treatment improves glucose homeostasis in insulin-resistant diabetic (ob/ob) mice. *Diabetologia* 45(1): 56-65 (2002).

Sparling DP, Griesel BA, Weems J, Olson AL. GLUT4 enhancer factor (GEF) interacts with MEF2A and HDAC5 to regulate the GLUT4 promoter in adipocytes. *J Biol Chem*. 283(12): 7429-7437 (2008).

Standaert ML, Bandyopadhyay G, Perez L, Price D, Galloway L, Poklepovic A, Sajan MP, Cenni V, Sirri A, Moscat J, Toker A, Farese RV. Insulin activates protein kinases C-zeta and C-lambda by an autophosphorylation-dependent mechanism and stimulates their translocation to GLUT4 vesicles and other membrane fractions in rat adipocytes. *J Biol Chem*. 274(36): 25308-25316 (1999).

Stephens TJ, Canny BJ, Snow RJ, McConell GK. 5'-aminoimidazole-4-carboxamide-ribonucleoside-activated glucose transport is not prevented by nitric oxide synthase inhibition in rat isolated skeletal muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 31(7): 419-423 (2004).

Sun Y, Chiu TT, Foley KP, Bilan PJ, Klip A. Myosin Va mediates Rab8A-regulated GLUT4 vesicle exocytosis in insulin-stimulated muscle cells. *Mol Biol Cell*. 25(7): 1159-1170 (2014).

Takatsu H, Yoshino K, Toda K, Nakayama K. GGA proteins associate with Golgi membranes through interaction between their GGAH domains and ADP-ribosylation factors. *Biochem J*. 365(Pt 2): 369-378 (2002).

Talior-Volodarsky I, Randhawa VK, Zaid H, Klip A. Alpha-actinin-4 is selectively required for insulin-induced GLUT4 translocation. *J Biol Chem*. 283(37): 25115-25123 (2008).

Taylor EB, An D, Kramer HF, Yu H, Fujii NL, Roeckl KS, Bowles N, Hirshman MF, Xie J, Feener EP, Goodyear LJ. Discovery of TBC1D1 as an insulin-, AICAR-, and contraction-stimulated signaling nexus in mouse skeletal muscle. *J Biol Chem*. 283(15): 9787-9796 (2008).

Thai MV, Guruswamy S, Cao KT, Pessin JE, Olson AL. Myocyte enhancer factor 2 (MEF2)-binding site is required for GLUT4 gene expression in transgenic mice. Regulation of MEF2 DNA binding activity in insulin-deficient diabetes. *J Biol Chem.* 273(23): 14285-14292 (1998).

Thurmond DC, Kanzaki M, Khan AH, Pessin JE. Munc18c function is required for insulin-stimulated plasma membrane fusion of GLUT4 and insulin-responsive amino peptidase storage vesicles. *Mol Cell Biol.* 20(1): 379-388 (2000).

Trebbak JT1, Birk JB, Rose AJ, Kiens B, Richter EA, Wojtaszewski JF. AS160 phosphorylation is associated with activation of $\alpha 2\beta 2\gamma 1$ - but not $\alpha 2\beta 2\gamma 3$ -AMPK trimeric complex in skeletal muscle during exercise in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292(3): E715-722 (2007).

Voliovitch H, Schindler DG, Hadari YR, Taylor SI, Accili D, Zick Y. Tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in vivo depends upon the presence of its pleckstrin homology region. *J Biol Chem.* 270(30): 18083-18087 (1995).

Wang HY, Ducommun S, Quan C, Xie B, Li M, Wasserman DH, Sakamoto K, Mackintosh C, Chen S. AS160 deficiency causes whole-body insulin resistance via composite effects in multiple tissues. *Biochem J.* 449(2): 479-489 (2013).

Watson RT, Khan AH, Furukawa M, Hou JC, Li L, Kanzaki M, Okada S, Kandrø KV, Pessin JE. Entry of newly synthesized GLUT4 into the insulin-responsive storage compartment is GGA dependent. *EMBO J.* 23(10): 2059-2070 (2004).

Watson RT, Pessin JE. GLUT4 translocation: the last 200 nanometers. *Cell Signal.* 19(11): 2209-2217 (2007).

Watson RT, Shigematsu S, Chiang SH, Mora S, Kanzaki M, Macara IG, Saltiel AR, Pessin JE. Lipid raft microdomain compartmentalization of TC10 is required for insulin signaling and GLUT4 translocation. *J Cell Biol.* 154(4): 829-840 (2001).

Witczak CA, Fujii N, Hirshman MF, Goodyear LJ. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase- α regulates skeletal muscle glucose uptake independent of AMP-activated protein kinase and Akt activation. *Diabetes* 56(5): 1403-1409 (2007).

Witczak CA, Jessen N, Warro DM, Toyoda T, Fujii N, Anderson ME, Hirshman MF, Goodyear LJ. CaMKII regulates contraction- but not insulin-induced glucose uptake in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 298(6): E1150-1160 (2010).

Wojtaszewski JF, Birk JB, Frøsig C, Holten M, Pilegaard H, Dela F. 5'AMP activated

protein kinase expression in human skeletal muscle: effects of strength training and type 2 diabetes. *J Physiol.* 564(Pt 2): 563-573 (2005).

Wright DC, Geiger PC, Holloszy JO, Han DH. Contraction- and hypoxia-stimulated glucose transport is mediated by a Ca^{2+} -dependent mechanism in slow-twitch rat soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288(6): E1062-1066 (2005).

Wright DC, Hucker KA, Holloszy JO, Han DH. Ca^{2+} and AMPK both mediate stimulation of glucose transport by muscle contractions. *Diabetes* 53(2): 330-335 (2004).

Xi C, Miyaki K, Ikeda S, Song Y, Sinbo T, Muramatsu M. Association of GLUT4 gene variants with HbA1c level in Japanese men. *Endocr J.* 59(8): 677-684 (2012).

Xu YK, Xu KD, Li JY, Feng LQ, Lang D, Zheng XX. Bi-directional transport of GLUT4 vesicles near the plasma membrane of primary rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 359(1): 121-128 (2007).

Yip MF, Ramm G, Larance M, Hoehn KL, Wagner MC, Guilhaus M, James DE. CaMKII-mediated phosphorylation of the myosin motor Myo1c is required for insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes. *Cell Metab.* 8(5): 384-398 (2008).

Youn JH, Gulve EA, Holloszy JO. Calcium stimulates glucose transport in skeletal muscle by a pathway independent of contraction. *Am J Physiol.* 260(3 Pt 1): C555-561 (1991).

Yu C, Cresswell J, Löffler MG, Bogan JS. The glucose transporter 4-regulating protein TUG is essential for highly insulin-responsive glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 282(10): 7710-7722 (2007).

Zaid H, Antonescu CN, Randhawa VK, Klip A. Insulin action on glucose transporters through molecular switches, tracks and tethers. *Biochem J.* 413(2): 201-215 (2008).

Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(2): 107-117 (2001).

Zheng D, MacLean PS, Pohnert SC, Knight JB, Olson AL, Winder WW, Dohm GL. Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase. *J Appl Physiol.* 91(3): 1073-1083 (2001).

Zhu G1, Zhai P, Liu J, Terzyan S, Li G, Zhang XC. Structural basis of Rab5-Rabaptin5 interaction in endocytosis. *Nat Struct Mol Biol* 11(10): 975-983 (2004).

ABSTRACT

Bioinformatics Research on Signaling Pathways that Affect Insulin Resistance

- Analysis of substrate specificity of AS160 and TBC1D1 -

Tae-Gon Yoo

**Laboratory of Computational Biology and Bioinformatics
Graduate School of Public Health
Seoul National University**

Diabetes mellitus is a chronic disease of which prevalence is increasing rapidly due to a decrease in physical activity and an increase in the prevalence of obesity. It should be managed strictly in order to decrease the risk of acute and chronic complications of diabetes. Type 2 diabetes, which comprises 90% of people with diabetes around the world, develops when the muscle cells and adipocytes of the body become resistant to insulin. It is GLUT4 (Glucose transporter 4) that transports glucose into the muscle cells and adipocytes. Insulin resistance is defined as the status that the response by insulin stimulation decreased at the cellular level, as a result of the impairment of the translocation of GLUT4 by insulin stimulation. It is necessary for us to know the insulin-stimulated signaling pathways exactly so as to discover the causes of insulin resistance. The insulin binds to the insulin receptor, and the insulin receptor activates Akt mediated by the activation of IRS (insulin receptor substrate), PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase), PDK1, and mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex-2). The activated Akt inactivates Rab GAP (Rab GTPase-activating protein) domain of AS160 by recognizing

and phosphorylating the specific motifs of AS160, and consequently the equilibrium of the target Rab proteins shifts to an active GTP-bound form, resulting in translocation of GLUT4 to the plasma membrane. On the other hand, a muscle contraction in muscle cells activates AMPK, and the translocation of GLUT4 is stimulated by phosphorylation of AS160 and TBC1D1 by activated AMPK. However, it isn't clearly known what the role of TBC1D1 and the substrate specificity of Rab GAP domain of TBC1D1 are. Therefore, this study aimed to anticipate the role of AS160 and TBC1D1 by identifying the substrate specificity and the pattern of protein interaction of Rab GAP domain of those to the specific Rab proteins. In this study, we analyzed the substrate specificity of Rab GAP domain using protein docking program. First of all, the structures of Rab GAP domain of AS160 and TBC1D1, and multiple Rab proteins were downloaded as PDB files from the Protein Data Bank, and the errors of PDB files were repaired using FoldX. Then, protein docking was performed by inputting them on Hex and ClusPro, and the interaction energy of the protein complexes that were selected as the best docking models were calculated by FoldX. Finally, the proportion of Rab proteins that interacted with Rab GAP domains were calculated when each interaction energy value was selected as the temporary cutoff value, and it was compared with the results of previous study. According to the previous study that made the double knockout mouse model of AS160 and TBC1D1 genes, the levels of contribution of the AS160 and TBC1D1 to glucose uptake were 47.72% and 48.15% each,. In the case of Hex, 91.41kcal/mol was appropriate for tentative cutoff values, and the Rab proteins that interacted with AS160 or TBC1D1 were Rab1A, Rab2A, Rab1A, Rab2A, Rab4A, Rab4B, Rab8A, Rab11A, and Rab18. In the case of ClusPro, 265.90kcal/mol was appropriate for tentative cutoff values, and the Rab proteins that interacted with AS160 or TBC1D1 were Rab1A, Rab5A, Rab7, Rab14, Rab18, and Rab21. These results were similar to another previous study that was in vitro. In conclusion, the rates of Rab proteins that interact with Rab GAP domains of AS160 and TBC1D1 are in proportion to the amounts of glucose uptake involved by

AS160 and TBC1D1.

.....
Keywords : Insulin resistance, GLUT4, AS160, TBC1D1, Rab proteins,
Protein docking

Student Number :2011-23868